

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2003 年 3 月 6 日 (06.03.2003)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 03/018795 A1

(51) 国際特許分類: C12N 15/09, C07K 7/08, 14/705, 16/28, C12N 5/10, C12P 21/08, C12Q 1/68, A61K 38/17, 39/395, 48/00, G01N 33/15, 33/50, 33/53, 33/566, 33/577

[JP/JP]; 〒590-0073 大阪府 堺市 南向陽町 1 丁 2 番 8 号 Osaka (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP02/08466

(74) 代理人: 高橋 秀一, 外(TAKAHASHI, Shuichi et al.); 〒532-0024 大阪府 大阪市淀川区 十三本町 2 丁目 1 7 番 8 5 号 武田薬品工業株式会社大阪工場内 Osaka (JP).

(22) 国際出願日: 2002 年 8 月 22 日 (22.08.2002)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願2001-254826 2001 年 8 月 24 日 (24.08.2001) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 武田薬品工業株式会社 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.) [JP/JP]; 〒541-0045 大阪府 大阪市中央区 道修町四丁目 1 番 1 号 Osaka (JP).

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 日沼 州司 (HINUMA, Shuji) [JP/JP]; 〒305-0821 茨城県 つくば市春日 1 丁目 7 番地 9-1 4 0 2 号 Ibaraki (JP). 吉田 博美 (YOSHIDA, Hiromi) [JP/JP]; 〒300-2741 茨城県 結城郡石下町 大字国生 1 4 4 番地の 2 3 Ibaraki (JP). 羽畑 祐吾 (HABATA, Yugo) [JP/JP]; 〒305-0044 茨城県 つくば市 並木 3 丁目 1 7 番地 1-6 0 6 号 Ibaraki (JP). 細谷 昌樹 (HOSOYA, Masaki) [JP/JP]; 〒300-0007 茨城県 土浦市 板谷 1 丁目 7 1 1 番地の 8 3 Ibaraki (JP). 北田 千恵子 (KITADA, Chieko)

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: NOVEL RFRP-3 AND DNA THEREOF

(54) 発明の名称: 新規 RFRP-3 およびその DNA

(57) Abstract: An RFRP-3 peptide which is a prolactin secretion promoter useful as preventives/remedies for various diseases relating to the secretion of prolactin such as hypoovarianism, spermatoc hypoplasia, menopause, hypothyroidism, etc.

(57) 要約:

本発明の RFRP-3 ペプチドはプロラクチン分泌促進剤として、卵巣機能低下症、精嚢発育不全、更年期障害または甲状腺機能低下などのプロラクチン分泌に関係する各種疾患の予防・治療薬として有用である。

WO 03/018795 A1

## 明 細 書

## 新規RFRP-3およびそのDNA

## 5 技術分野

本発明は、プロラクチン分泌調節作用を有する新規ポリペプチド（以下、RFRP-3と略記する場合がある）、それをコードするポリヌクレオチド、RFRP-3の製造法およびRFRP-3もしくはそのDNAの用途などに関する。

10

## 背景技術

多くのホルモンや神経伝達物質は細胞膜に存在する特異的なレセプターを通じて生体の機能を調節している。これらのレセプターの多くは共役しているグアニンヌクレオチド結合性蛋白質（guanine nucleotide-binding protein、  
15 以下、G蛋白質と略称する場合がある）の活性化を通じて細胞内のシグナル伝達を行う。また、これらのレセプターは、7個の細胞膜貫通領域を有する共通した構造をもっていることから、G蛋白質共役型レセプターあるいは7回膜貫通型レセプター（7TMR）と総称される。

このようなホルモンや神経伝達物質とG蛋白質共役型レセプターによる生  
20 体の機能を調節する経路の一つとして視床下部一下垂体系がある。これは、視床下部ホルモン（向下垂体性ホルモン）によって下垂体からの下垂体ホルモンの分泌が調節され、血中に放出された下垂体ホルモンを介して標的細胞・器官の機能調節が行われるものである。この経路によって、ホメオスタシスの維持や生殖系、個体の発達、代謝、成長の調節などの生体にとって重  
25 要な機能調節が行われている。

下垂体ホルモンは視床下部ホルモンと標的内分泌腺より分泌される末梢ホルモンによるポジティブフィードバック機構またはネガティブフィードバック機構によって分泌調節されている。

また、これらのホルモン、因子およびそのレセプターは、視床下部一下垂

体系だけに限局して存在するのではなく、一般に脳内に広く分布することが知られている。このことから、視床下部ホルモンと呼ばれている物質が、中枢神経系においては神経伝達物質あるいは神経調節物質として機能していると考えられている。

- 5        また、末梢組織においても同様に分布し、それぞれ重要な機能を担っていると考えられている。

以上のことから、G蛋白質共役型レセプターとそのリガンドによる生体の機能の調節、とくに視床下部ホルモンの分泌調節により下垂体からの下垂体ホルモンの分泌を調節する薬剤の開発が望まれていた。

- 10        ネイチャー・セル・バイオロジー (Nature Cell Biology) , Vol. 2, October 2000, p703-708には、プロラクチンの放出を調節する作用を有するペプチドが記載されている。

- WO 00/29441号には、RFRP-1、RFRP-2およびRFRP-3と呼ばれる分泌ペプチドおよび該分泌ペプチドが結合するG蛋白質共役型  
15        レセプター蛋白質OT7T022が記載されている。

WO 01/66134号には、該分泌ペプチドがプロラクチン分泌調節作用を有することが記載されている。

本発明は、優れたプロラクチンの放出を調節する作用を有する新規ポリペプチドを提供することを課題とする。

20

#### 発明の開示

本発明者らは、上記の課題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、RFamide様構造を有することを特徴とするウシRFRP-3の単離・精製に成功し、さらに検討を重ねた結果、本発明を完成するに至った。

- 25        すなわち、本発明は、

〔1〕 (1) 配列番号：1の第104番目 (Ala) ないし第131番目 (Phe) のアミノ酸配列からなるペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、 (2) 配列番号：1の第101番目 (Ser) ないし第131番目 (Phe) のアミノ酸配列からなるペプチドもしくはそのアミドもしくはその

エステルまたはその塩または (3) 配列番号: 14 の第104番目 (Ala) ないし第131番目 (Phe) のアミノ酸配列からなるペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、

- 〔2〕 (1) 配列番号: 1 で表わされるアミノ酸配列の第125番目 (Pro) ないし第131番目 (Phe) のアミノ酸配列からなるペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、 (2) 配列番号: 1 で表わされるアミノ酸配列の第126番目 (Asn) ないし第131番目 (Phe) のアミノ酸配列からなるペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩または (3) 配列番号: 1 で表わされるアミノ酸配列の第127番目 (Leu) ないし第131番目 (Phe) のアミノ酸配列からなるペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、

〔3〕 上記〔1〕または〔2〕記載のペプチドのアミドまたはその塩、

〔4〕 C末端のカルボキシル基がアミド化されている上記〔1〕または〔2〕記載のペプチドまたはその塩、

- 〔5〕 上記〔1〕記載のペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド、

〔6〕 上記〔2〕記載のペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド、

〔7〕 DNAである上記〔5〕または〔6〕記載のポリヌクレオチド、

- 〔8〕 (1) 配列番号: 2 の第310番目ないし第393番目の塩基配列、 (2) 配列番号: 2 の第301番目ないし第393番目の塩基配列、または (3) 配列番号: 15 の第310番目ないし第393番目の塩基配列からなる上記〔5〕記載のポリヌクレオチド、

- 〔9〕 (1) 配列番号: 2 の第373番目ないし第393番目の塩基配列、 (2) 配列番号: 2 の第376番目ないし第393番目の塩基配列、または (3) 配列番号: 2 の第379番目ないし第393番目の塩基配列からなる上記〔6〕記載のポリヌクレオチド、

〔10〕 上記〔5〕または〔6〕記載のポリヌクレオチドを含有する組換えベクター、



- 〔１１〕上記〔１０〕記載の組換えベクターで形質転換させた形質転換体、  
〔１２〕上記〔１１〕記載の形質転換体を培養し、上記〔１〕または〔２〕  
記載のペプチドを生成せしめることを特徴とする上記〔１〕または〔２〕記  
載のペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の製造  
法、  
5      〔１３〕上記〔１〕または〔２〕記載のペプチドもしくはそのアミドもしくは  
はそのエステルまたはその塩を含有してなる医薬、  
〔１４〕上記〔５〕または〔６〕記載のポリヌクレオチドを含有してなる医  
薬、  
10      〔１５〕プロラクチン分泌調節剤である上記〔１３〕または〔１４〕記載の  
医薬、  
〔１６〕プロラクチン分泌促進剤である上記〔１３〕または〔１４〕記載の  
医薬、  
〔１７〕プロラクチン分泌抑制剤である上記〔１３〕または〔１４〕記載の  
15      医薬、  
〔１８〕卵巢機能低下症、精囊発育不全、骨粗鬆症、更年期障害、乳汁分泌  
不全、甲状腺機能低下または腎不全の予防・治療薬である上記〔１６〕記載  
の医薬、  
〔１９〕高プロラクチン血症、下垂体腺腫瘍、間脳腫瘍、月経異常、ストレ  
20      ス、自己免疫疾患、プロラクチノーマ、不妊症、インポテンス、無月経症、  
乳汁漏症、末端肥大症、キアリ・フロンメル（Chiari-Frommel）症候群、ア  
ルゴンツ-デル・カスティロ（Argonz-del Castilo）症候群、フォーベス・ア  
ルブライト（Forbes-Albright）症候群、乳癌リンパ腫、シーハン症候群また  
は精子形成異常の予防・治療剤である上記〔１７〕記載の医薬、  
25      〔２０〕哺乳動物の乳汁の分泌促進剤である上記〔１３〕または〔１４〕記  
載の医薬、  
〔２１〕プロラクチン分泌機能の検査薬である上記〔１３〕または〔１４〕  
記載の医薬、  
〔２２〕上記〔１〕または〔２〕記載のペプチドもしくはそのアミドもしくは

はそのエステルまたはその塩に対する抗体、

〔23〕上記〔22〕記載の抗体を含有してなる医薬、

- 〔24〕高プロラクチン血症、下垂体腺腫瘍、間脳腫瘍、月経異常、ストレス、自己免疫疾患、プロラクチノーマ、不妊症、インポテンス、無月経症、乳汁漏症、末端肥大症、キアリ・フロンメル (Chiari-Frommel) 症候群、アルゴンツ-デル・カスティロ (Argonz-del Castilo) 症候群、フォーベス・アルブライト (Forbes-Albright) 症候群、乳癌リンパ腫またはシーハン症候群または精子形成異常の予防・治療剤である上記〔23〕記載の医薬、

〔25〕上記〔22〕記載の抗体を含有してなる診断剤、

- 〔26〕卵巣機能低下症、精囊発育不全、骨粗鬆症、更年期障害、乳汁分泌不全、甲状腺機能低下または腎不全、高プロラクチン血症、下垂体腺腫瘍、間脳腫瘍、月経異常、ストレス、自己免疫疾患、プロラクチノーマ、不妊症、インポテンス、無月経症、乳汁漏症、末端肥大症、キアリ・フロンメル (Chiari-Frommel) 症候群、アルゴンツ-デル・カスティロ (Argonz-del Castilo) 症候群、フォーベス・アルブライト (Forbes-Albright) 症候群、乳癌リンパ腫またはシーハン症候群または精子形成異常の診断剤である上記〔25〕記載の診断剤、

〔27〕上記〔5〕または〔6〕記載のポリヌクレオチドを含有してなる診断剤、

- 〔28〕卵巣機能低下症、精囊発育不全、骨粗鬆症、更年期障害、乳汁分泌不全、甲状腺機能低下または腎不全、高プロラクチン血症、下垂体腺腫瘍、間脳腫瘍、月経異常、ストレス、自己免疫疾患、プロラクチノーマ、不妊症、インポテンス、無月経症、乳汁漏症、末端肥大症、キアリ・フロンメル (Chiari-Frommel) 症候群、アルゴンツ-デル・カスティロ (Argonz-del Castilo) 症候群、フォーベス・アルブライト (Forbes-Albright) 症候群、乳癌リンパ腫またはシーハン症候群または精子形成異常の診断剤である上記〔27〕記載の診断剤、

〔29〕上記〔1〕または〔2〕記載のペプチドをコードするDNAに相補的または実質的に相補的な塩基配列またはその一部を有し、該DNAの発現

を抑制し得る作用を有するアンチセンスDNA、

〔30〕上記〔29〕記載のアンチセンスDNAを含有してなる医薬、

- 〔31〕高プロラクチン血症、下垂体腺腫瘍、間脳腫瘍、月経異常、ストレス、自己免疫疾患、プロラクチノーマ、不妊症、インポテンス、無月経症、  
5 乳汁漏症、末端肥大症、キアリ・フロンメル (Chiari-Frommel) 症候群、アルゴンツ-デル・カスティロ (Argonz-del Castilo) 症候群、フォーベス・アルブライト (Forbes-Albright) 症候群、乳癌リンパ腫またはシーハン症候群または精子形成異常の予防・治療剤である上記〔30〕記載の医薬、

- 〔32〕上記〔1〕または〔2〕記載のペプチドもしくはそのアミドもしくは  
10 はそのエステルまたはその塩を用いることを特徴とする上記〔1〕または〔2〕記載のペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、

- 〔33〕さらに配列番号：37で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質またはその塩、またはその部分ペ  
15 プチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を用いることを特徴とする上記〔32〕記載のスクリーニング方法、

- 〔34〕さらに配列番号：37または配列番号：54で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質またはその塩、またはその部分ペプチドもしくはそのアミ  
20 ドもしくはそのエステルまたはその塩を用いることを特徴とする上記〔32〕記載のスクリーニング方法、

- 〔35〕上記〔1〕または〔2〕記載のペプチドもしくはそのアミドもしくは  
はそのエステルまたはその塩を含有してなる上記〔1〕または〔2〕記載のペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット、

- 〔36〕上記〔32〕記載のスクリーニング方法または上記〔35〕記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、上記〔1〕または〔2〕記載  
25 のペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩、

〔37〕上記〔1〕または〔2〕記載のペプチドもしくはそのアミドもしくは

はそのエステルまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩を含有してなる医薬、

- 5     〔38〕上記〔1〕または〔2〕記載のペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を促進する化合物またはその塩を含有してなるプロラクチン分泌促進剤、

〔39〕上記〔1〕記載のペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を促進する化合物またはその塩を含有してなる卵巣機能低下症、精嚢發育不全、骨粗鬆症、更年期障害、乳汁分泌不全、甲状腺機能低下または腎不全の予防・治療剤、

- 10     〔40〕上記〔1〕または〔2〕記載のペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を促進する化合物またはその塩を含有してなる哺乳動物の乳汁の分泌促進剤、

- 15     〔41〕上記〔1〕または〔2〕記載のペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を阻害する化合物またはその塩を含有してなるプロラクチン分泌抑制剤、

- 20     〔42〕上記〔1〕または〔2〕記載のペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を阻害する化合物またはその塩を含有してなる高プロラクチン血症、下垂体腺腫瘍、間脳腫瘍、月経異常、ストレス、自己免疫疾患、プロラクチノーマ、不妊症、インポテンス、無月経症、乳汁漏症、末端肥大症、キアリ・フロンメル（Chiari-Frommel）症候群、アルゴンツ-デル・カスティロ（Argonz-del Castilo）症候群、フォーベス・アルブライト（Forbes-Albright）症候群、乳癌リンパ腫、シーハン症候群または精子形成異常の予防・治療剤、

- 25     〔43〕哺乳動物に対して、①上記〔1〕または〔2〕記載のペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、②上記〔5〕または〔6〕記載のポリヌクレオチドまたは③上記〔1〕または〔2〕記載のペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を促進する化合物またはその塩の有効量を投与することを特徴とするプロラクチン分泌促進方法、

〔４４〕哺乳動物に対して、①上記〔１〕または〔２〕記載のペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、②上記〔５〕または〔６〕記載のポリヌクレオチドまたは③上記〔１〕または〔２〕記載のペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を促進する化合物またはその塩の有効量を投与することを特徴とする卵巣機能低下症、精囊  
5 發育不全、骨粗鬆症、更年期障害、乳汁分泌不全、甲状腺機能低下または腎不全の予防・治療方法、

〔４５〕哺乳動物に対して、①上記〔２２〕記載の抗体、②上記〔２９〕記載のアンチセンスDNAまたは③上記〔１〕または〔２〕記載のペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を阻害する化合物またはその塩の有効量を投与することを特徴とするプロラクチン分泌抑制  
10 方法、

〔４６〕哺乳動物に対して、①上記〔２２〕記載の抗体、②上記〔２９〕記載のアンチセンスDNAまたは③上記〔１〕または〔２〕記載のペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を阻害する化合物またはその塩の有効量を投与することを特徴とする高プロラクチン血症、  
15 下垂体腺腫瘍、間脳腫瘍、月経異常、ストレス、自己免疫疾患、プロラクチノーマ、不妊症、インポテンス、無月経症、乳汁漏症、末端肥大症、キアリ・フロンメル (Chiari-Frommel) 症候群、アルゴンツ-デル・カスティロ (Argonz-del Castilo) 症候群、フォーベス・アルブライト (Forbes-Albright) 症候群、乳癌リンパ腫、シーハン症候群または精子形成異常の予防・治療方法、  
20

〔４７〕プロラクチン分泌促進剤を製造するための①上記〔１〕または〔２〕記載のペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、②  
25 上記〔５〕または〔６〕記載のポリヌクレオチドまたは③上記〔１〕または〔２〕記載のペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を促進する化合物またはその塩の使用、

〔４８〕卵巣機能低下症、精囊發育不全、骨粗鬆症、更年期障害、乳汁分泌不全、甲状腺機能低下または腎不全の予防・治療剤を製造するための①上記

〔1〕または〔2〕記載のペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、②上記〔5〕または〔6〕記載のポリヌクレオチドまたは③上記〔1〕または〔2〕記載のペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を促進する化合物またはその塩の使用、

- 5   〔49〕プロラクチン分泌阻害剤を製造するための①上記〔22〕記載の抗体、②上記〔29〕記載のアンチセンスDNAまたは③上記〔1〕または〔2〕記載のペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を阻害する化合物またはその塩の使用、および

- 10   〔50〕高プロラクチン血症、下垂体腺腫瘍、間脳腫瘍、月経異常、ストレス、自己免疫疾患、プロラクチノーマ、不妊症、インポテンス、無月経症、乳汁漏症、末端肥大症、キアリ・フロンメル（Chiari-Frommel）症候群、アルゴンツ・デル・カスティロ（Argonz-del Castilo）症候群、フォーベス・アルブライト（Forbes-Albright）症候群、乳癌リンパ腫、シーハン症候群または精子形成異常の予防・治療剤を製造するための①上記〔22〕記載の抗体、
- 15   ②上記〔29〕記載のアンチセンスDNAまたは③上記〔1〕または〔2〕記載のペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を阻害する化合物またはその塩の使用を提供する。

#### 図面の簡単な説明

- 20   図1は参考例2で得られた本発明のポリペプチド（ヒト型）をコードするDNAの塩基配列および該塩基配列から推定されるアミノ酸配列を示す。  
図2は本発明のポリペプチドの疎水性プロットを示す図を示す。  
図3は参考例3で得られた本発明のポリペプチド（ヒト型）をコードするDNAの塩基配列および該塩基配列から推定されるアミノ酸配列を示す。
- 25   図4は参考例4で得られた本発明のポリペプチド（ウシ型）をコードするDNAの塩基配列および該塩基配列から推定されるアミノ酸配列を示す。  
図5は参考例5で得られた本発明のポリペプチド（ラット型）をコードするDNAの塩基配列および該塩基配列から推定されるアミノ酸配列を示す。  
図6は参考例3、4、5で得られた本発明のポリペプチドのアミノ酸配列の

比較を示す。

図7は参考例6で得られた本発明のポリペプチド（マウス型）のアミノ酸配列および該ポリペプチドをコードするDNAの塩基配列を示す。

図8は参考例7で行われたサイトセンサーによるrOT7T022L受容体発現CHO細胞に対するペプチドの反応性を示す図を示す。図中、●—●はMPHSFANLPLRFamide（配列番号：39）、△—△はVPNLPQRFamide（配列番号：40）を示す。

図9は参考例10で行われたMPHSFANLPLRFamide（配列番号：39）、VPNLPQRFamide（配列番号：40）のrOT7T022L発現CHO細胞に対するcAMP産生抑制活性を示す図を示す。図中、□—□はMPHSFANLPLRFamide（配列番号：39）、●—●はVPNLPQRFamide（配列番号：40）を示す。

図10は実施例A1で行われた血漿中に含まれるプロラクチン量の測定結果を示す。図中、●—●は配列番号：39で表わされるペプチドを溶解させたPBS投与群のプロラクチン量を、○—○はPBSのみを投与した対照群のプロラクチン量を示す。

また、投与した時間を0分とし、\*は危険率： $p < 0.05$ を、\*\*は危険率： $p < 0.01$ を示す。

図11は参考例13で行われた抗ラット型RFRP-1モノクローナル抗体1F3を用いた競合的EIAにおけるRFアミド関連ペプチドの反応性の結果を示す。

抗マウスIgGAM抗体をコートした96穴プレートに、抗ラット型RFRP-1モノクローナル抗体1F3  $50 \mu\text{l}$ 、横軸に示す濃度のペプチド  $50 \mu\text{l}$ を加えた。 $4^{\circ}\text{C}$ にて16時間インキュベートした後、HRP-rat RFRP-1を加え、さらに室温で2時間インキュベートした。プレートを洗浄後、HRP活性を450nmにおける吸光度として測定した。Bはペプチドを加えたときの吸光度、 $B_0$ はペプチドを加えないときの吸光度を示す。

図中、—●—は配列番号：50で表されるアミノ酸配列の第83番目（Val）～第94番目（Phe）のアミノ酸配列のC末端のカルボキシル基がアミド化されたペプチド（VPHSAANLPLRF-NH<sub>2</sub>）、—▲—は配列番号：50で表されるアミノ酸配列の第90番目（Leu）～第94番目（Phe）のアミ

- ノ酸配列のC末端のカルボキシル基がアミド化されたペプチド(LPLRF-NH<sub>2</sub>)、  
 —■—は配列番号：1で表されるアミノ酸配列の第124番目(Val)～  
 第131番目(Phe)のアミノ酸配列のC末端のカルボキシル基がアミド  
 化されたペプチド(VPNLPQRF-NH<sub>2</sub>)、—◆—は配列番号：1で表されるアミノ  
 5 酸配列の第128番目(Pro)～第131番目(Phe)のアミノ酸配列  
 のC末端のカルボキシル基がアミド化されたペプチド(PQRF-NH<sub>2</sub>)を示す。  
 図12は実施例A2で行われたウシ視床下部からの内因性RFRP-1の最終精製  
 のクロマトパターン図を示す。最終精製段階の  $\mu$ RPC C2/C18 SC 2.1/10 の  
 クロマトグラムを示す。縦軸は215nmの吸光度とアセトニトリルの溶出濃度を  
 10 示し、横軸は溶出時間を示す。図中の黒いカラムは各フラクションの抗ラッ  
 ト型RFRP-1モノクローナル抗体1F3を用いた競合的EIAを用いて測定した  
 RFRP-1様免疫活性を示す。  
 図13は実施例A4で得られたプラスミドpTFCRFRP-1の構築図を示す。  
 図14は実施例A8で行われた各種ペプチドのホルスコリン処理による細胞  
 15 内cAMP量の増加抑制活性を示す図を表す。図中、—○—はhRFRP-1-12(配列  
 番号：1の第81番目(Met)ないし第92番目(Phe)のアミノ酸配列を含  
 有するペプチド)、—■—はhRFRP-1-37(配列番号：1の第56番目(Ser)  
 ないし第92番目(Phe)のアミノ酸配列を含有するペプチド)、—◇—は  
 rRFRP-1-37(配列番号：50の第58番目(Ser)ないし第94番目(Phe)  
 20 のアミノ酸配列を含有するペプチド、—▲—はhRFRP-2-12(配列番号：1の  
 第101番目(Phe)ないし第112番目(Ser)のアミノ酸配列を含有する  
 ペプチド、—□—はhRFRP-3-8(配列番号：1の第124番目(Val)ないし  
 第131番目(Phe)のアミノ酸配列を含有するペプチド、—◆—はPQRFamide  
 (Pro-Gln-Arg-Phe-NH<sub>2</sub>で表されるペプチド、—●—はLPLRFamide  
 (Leu-Pro-Leu-Arg-Phe-NH<sub>2</sub>で表されるペプチド、—▲—はNPFF  
 25 (Asn-Pro-Phe-Pheで表されるペプチド)を示す。

図15は実施例A9で行われたRFRPペプチドによるヒトOT7T022受容体の活  
 性化に及ぼす百日咳毒素の効果をcAMP産生抑制作用を指標にして表した図を  
 示す。



図 1 6 は抗ラット型RFRP-3モノクローナル抗体7F6を用いた競合的EIAにおけるRFアミド関連ペプチドの反応性を示す。Bはペプチドを加えたときの吸光度、B0はペプチドを加えないときの吸光度を示す。

- 5 図 1 7 はウシ視床下部からの内因性RFRP-3の最終精製のクロマトパターンを示す。クロマトのチャートは215nmの吸光度とアセトニトリルの溶出濃度を示し、図中の黒いカラムは各フラクションの抗ラット型RFRP-3モノクローナル抗体7F6を用いた競合的EIA を用いて測定したRFRP-3様免疫活性を示す。

図 1 8 はウシ視床下部から精製した内因性R F R P - 3 最終精製標品のN末端アミノ酸を分析した結果を示す。

- 10 図 1 9 はウシ視床下部から精製した内因性R F R P - 3 最終精製標品の分子量を測定した結果を示す。

図 2 0 は5価の分子関連イオン(m/z 661)をプリカーサーイオンとして測定したウシ視床下部から精製した内因性R F R P - 3 最終精製標品MS/MSスペクトルを示す。

- 15 図 2 1 は抗ラット型RFRP-3ポリクローナル抗体を用いた競合的EIAにおけるRFアミド関連ペプチドの反応性を示す。Bはペプチドを加えたときの吸光度、B0はペプチドを加えないときの吸光度を示す。

発明を実施するための最良の形態

- 20 配列番号：1 で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチド（以下、本発明のポリペプチドと称する場合がある）は、ヒトや温血動物（例えば、モルモット、ラット、マウス、ニワトリ、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サルなど）の細胞（例えば、網膜細胞、肝細胞、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、膵臓β細胞、骨髄細胞、メ
- 25 サンギウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、内皮細胞、繊維芽細胞、繊維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞（例、マクロファージ、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球）、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞、肝細胞もしくは間質細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞

もしくは癌細胞など) もしくはそれらの細胞が存在するあらゆる組織、例えば、脳、脳の各部位(例、網膜、嗅球、扁桃核、大脳基底核、海馬、視床、視床下部、大脳皮質、延髄、小脳)、脊髄、下垂体、胃、膵臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髄、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管(例、大腸、小腸)、血管、心臓、胸腺、脾臓、顎下腺、末梢血、前立腺、睾丸、卵巣、胎盤、子宮、骨、関節、骨格筋など、または血球系の細胞もしくはその培養細胞(例えば、MEL, M1, CTLL-2, HT-2, WEHI-3, HL-60, JOSK-1, K562, ML-1, MOLT-3, MOLT-4, MOLT-10, CCRF-CEM, TALL-1, Jurkat, CRT-HSB-2, KE-37, SKW-3, HUT-78, HUT-102, H9, U937, THP-1, HEL, JK-1, CMK, KO-812, MEG-01など) に由来するポリペプチドであってもよく、合成ポリペプチドであってもよい。

配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、さらに好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列などがあげられる。

配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、例えば、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列の第22～180番目のアミノ酸配列を含有するアミノ酸配列などがあげられる。

配列番号：1で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としてより具体的には、例えば、配列番号8、配列番号：14、配列番号：18、配列番号：33または配列番号：50で表されるアミノ酸配列などがあげられる。

配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドとしては、例えば、前記の配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列(例えば、配列番号：8、配列番号：14、配列番号：18、配列番号：33または配列番号：50で表されるアミノ酸配列など)を含有し、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列

を含有するポリペプチドと同様にプロラクチン分泌調節活性を有するポリペプチドである。

実質的に同質とは、それらの活性が性質的に（例、生理化学的に、または薬理学的に）同質であることを示す。従って、プロラクチン分泌調節活性が  
5 同等（例、約0.1～100倍、好ましくは約0.5～10倍、より好ましくは0.5～2倍）であることが好ましいが、これらの活性の程度、ポリペプチドの分子量などの量的要素は異なってもよい。

プロラクチン分泌調節活性の測定は、自体公知の方法に準じて行なうことができるが、例えば、後述する実施例1に従って測定することができる。

10 また、本発明のポリペプチドとしては、例えば、①配列番号：1、配列番号：8、配列番号：14、配列番号：18、配列番号：33または配列番号：50で表わされるアミノ酸配列中の1～20個（好ましくは、1～15個、さらに好ましくは、1～5個、より好ましくは、1～3個）のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、②配列番号：1、配列番号：8、配列番号：14、配  
15 列番号：18、配列番号：33または配列番号：50で表わされるアミノ酸配列に1～20個（好ましくは、1～15個、さらに好ましくは、1～5個、より好ましくは、1～3個）のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、③配列番号：1、配列番号：8、配列番号：14、配列番号：18、配列番号：33  
20 または配列番号：50で表わされるアミノ酸配列に1～20個（好ましくは、1～15個、さらに好ましくは、1～5個、より好ましくは、1～3個）のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列、④配列番号：1、配列番号：8、配列番号：14、配列番号：18、配列番号：33または配列番号：50で表わされるアミノ酸配列中の1～20個（好ましくは、1～15個、さらに好ましくは、1～5個、より好ましくは、1～3個）のアミノ酸が他のアミノ酸  
25 で置換されたアミノ酸配列、または⑤それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有するポリペプチドなどのいわゆるムテインも含まれる。

上記のようにアミノ酸配列が挿入、欠失または置換されている場合、その挿入、欠失または置換の位置としては、特に限定されない。

配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を

含有するポリペプチドの具体例としては、例えば、配列番号：8で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチド、配列番号：14で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチド、配列番号：18で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチド、配列番号：33で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチド、配列番号：50で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドなどがあげられる。

本明細書におけるポリペプチドは、ペプチド標記の慣例に従って左端がN末端（アミノ末端）、右端がC末端（カルボキシル末端）である。配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをはじめとする、本発明のポリペプチドは、C末端がカルボキシル基（ $-\text{COOH}$ ）、カルボキシレート（ $-\text{COO}^-$ ）、アミド（ $-\text{CONH}_2$ ）またはエステル（ $-\text{COOR}$ ）の何れであってもよい。

ここでエステルにおけるRとしては、例えば、メチル、エチル、 $n$ -プロピル、イソプロピルもしくは $n$ -ブチルなどの $\text{C}_{1-6}$ アルキル基、例えば、シクロペンチル、シクロヘキシルなどの $\text{C}_{5-8}$ シクロアルキル基、例えば、フェニル、 $\alpha$ -ナフチルなどの $\text{C}_{6-12}$ アリール基、例えば、ベンジル、フェネチルなどのフェニル- $\text{C}_{1-2}$ アルキル基もしくは $\alpha$ -ナフチルメチルなどの $\alpha$ -ナフチル- $\text{C}_{1-2}$ アルキル基などの $\text{C}_{7-14}$ アラルキル基のほか、経口用エステルとして汎用されるピバロイルオキシメチル基などが用いられる。

本発明のポリペプチドがC末端以外にカルボキシル基（またはカルボキシレート）を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているものも本発明のポリペプチドに含まれる。この場合のエステルとしては、例えば上記したC末端のエステルなどが用いられる。

さらに、本発明のポリペプチドには、N末端のアミノ酸残基（例、メチオニン残基）のアミノ基が保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などの $\text{C}_{1-6}$ アルカノイルなどの $\text{C}_{1-6}$ アシル基など）で保護されているもの、生体内で切断されて生成するN末端のグルタミン残基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基（例えば $-\text{OH}$ 、 $-\text{SH}$ 、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基など）が適当な保護基（例え

ば、ホルミル基、アセチル基などの $C_{1-6}$ アルカノイル基などの $C_{1-6}$ アシル基など)で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖タンパク質などの複合タンパク質なども含まれる。以下、これらのポリペプチドを本発明のポリペプチドと略称することもある。

- 5      本発明のポリペプチドの具体例としては、例えば、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を含有するヒト由来のポリペプチド、配列番号：8で表わされるアミノ酸配列を含有するヒト由来のポリペプチド、配列番号：14で表わされるアミノ酸配列を含有するウシ由来のポリペプチド、配列番号：18で表わされるアミノ酸配列を含有するラット由来のポリペプチド、配列番号：33で表わされるアミノ酸配列を含有するマウス由来のポリペプチド、  
10      配列番号：50で表わされるアミノ酸配列を含有するラット由来のポリペプチドなどが用いられ、例えば、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を含有するヒト由来のポリペプチド、配列番号：8で表わされるアミノ酸配列を含有するヒト由来のポリペプチド、配列番号：14で表わされるアミノ酸配列を含有するウシ由来のポリペプチドが好ましく用いられる。  
15

- 本発明のRFRRP-3は、①配列番号：1で表わされるアミノ酸配列の第104番目(Ala)～第131番目(Phe)のアミノ酸配列(配列番号：63)、  
①配列番号：1で表わされるアミノ酸配列の第101番目(Ser)～第131番目(Phe)のアミノ酸配列(配列番号：65)または③配列番号：14で表  
20      わされるアミノ酸配列の第104番目(Ser)～第131番目(Phe)のアミノ酸配列(配列番号：67)からなる。

- また、本発明のRFRRP-3は、そのアミノ酸配列中の1～5個(好ましくは、1～3個のアミノ酸が欠失し、または、そのアミノ酸配列に1～5個  
(好ましくは、1～3個)のアミノ酸が付加し、または、そのアミノ酸配列  
25      に1～5個(好ましくは、1～3個のアミノ酸が挿入され、または、そのアミノ酸配列中の1～5個(好ましくは、1～3個のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列を含有していてもよく、それらを組み合わせたアミノ酸配列を有していてもよい。

さらに、本発明のRFRRP-3としては、少なくともC末端側に配列番号：

1 または配列番号：12で表わされるアミノ酸配列の第127番目 (Leu) ～  
第131番目 (Phe) のアミノ酸配列 (配列番号：69) を含有するペプチド  
なども使用することができる。具体的には、配列番号：1または配列番号：  
12で表わされるアミノ酸配列の第124番目 (Val) ～第131番目 (Phe)  
5 のアミノ酸配列 (配列番号：72) からなるペプチド (RFRP-3 (8))、  
第125番目 (Pro) ～第131番目 (Phe) のアミノ酸配列 (配列番号：71)  
からなるペプチド (RFRP-3 (7))、配列番号：1または配列番号：  
12で表わされるアミノ酸配列の第126番目 (Asn) ～第131番目  
(Phe) のアミノ酸配列 (配列番号：70) からなるペプチド (RFRP-3  
10 (6)) または配列番号：1または配列番号：12で表わされるアミノ酸配  
列の第127番目 (Leu) ～第131番目 (Phe) のアミノ酸配列 (配列番号：  
69) からなるペプチド (RFRP-3 (5)) などを使用することができ、  
なかでも配列番号：1で表わされるアミノ酸配列の第125番目 (Pro) ～第  
131番目 (Phe) のアミノ酸配列 (配列番号：71) からなるペプチド (R  
15 FRP-3 (7))、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列の第126番  
目 (Asn) ～第131番目 (Phe) のアミノ酸配列 (配列番号：70) からな  
るペプチド (RFRP-3 (6)) または配列番号：1で表わされるアミノ  
酸配列の第127番目 (Leu) ～第131番目 (Phe) のアミノ酸配列 (配列  
番号：69) からなるペプチド (RFRP-3 (5)) などが好ましく使用  
20 され、特に配列番号：1で表わされるアミノ酸配列の第125番目 (Pro) ～  
第131番目 (Phe) のアミノ酸配列 (配列番号：71) からなるペプチド (R  
FRP-3 (7)) が好ましく使用される。これらペプチドのC末端はアミ  
ドである場合が好ましい。

また、本発明のRFRP-3はC末端がカルボキシル基 ( $-\text{COOH}$ )、  
25 カルボキシレート ( $-\text{COO}^-$ )、アミド ( $-\text{CONH}_2$ ) またはエステル ( $-\text{COOR}$ )  
(Rは上記と同意義を示す) の何れであってもよい。なかでも、  
C末端がアミド ( $-\text{CONH}_2$ ) であるものが好ましい。

本発明のRFRP-3がC末端以外にカルボキシル基 (またはカルボキシ  
レート) を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化さ

れているものも本発明のポリペプチドに含まれる。この場合のエステルとしては、例えば上記したC末端のエステルなどが用いられる。

さらに、本発明のRFRP-3には、前記した本発明のポリペプチドと同様に、N末端のアミノ酸残基（例、メチオニン残基）のアミノ基が保護基で保護されているもの、N端側が生体内で切断され生成したグルタミン残基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基が適当な保護基で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖ペプチドなどの複合ペプチドなども含まれる。

本発明のRFRP-3は、RFamide構造を有している。RFamide構造とは、ペプチドのC末端がArginine（アルギニン）-Phenylalanine（フェニルアラニン）-NH<sub>2</sub>構造になっていることをいう。

本発明のポリペプチドまたは本発明のRFRP-3の塩としては、生理学的に許容される酸（例、無機酸、有機酸）や塩基（例、アルカリ金属塩）などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。

本発明のポリペプチドもしくはその塩または本発明のRFRPもしくはその塩は、前述したヒトや温血動物の細胞または組織から自体公知のポリペプチドの精製方法によって製造することもできるし、後述するポリペプチドをコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによっても製造することができる。また、後述のペプチド合成法に準じて製造することもできる。

ヒトや哺乳動物の組織または細胞から製造する場合、ヒトや哺乳動物の組織または細胞をホモジナイズした後、酸などで抽出を行ない、該抽出液を逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーなどのクロマトグラフィーを組み合わせることにより精製単離することができる。

本発明のポリペプチドもしくはその塩、または本発明のRFRPもしくはその塩の合成には、通常市販のポリペプチド合成用樹脂を用いることができ

る。そのような樹脂としては、例えば、クロロメチル樹脂、ヒドロキシメチル樹脂、ベンズヒドリルアミン樹脂、アミノメチル樹脂、4-ベンジルオキシベンジルアルコール樹脂、4-メチルベンズヒドリルアミン樹脂、PAM樹脂、4-ヒドロキシメチルメチルフェニルアセトアミドメチル樹脂、ポリ  
5 アクリルアミド樹脂、4-(2',4'-ジメトキシフェニル-ヒドロキシメチル)フェノキシ樹脂、4-(2',4'-ジメトキシフェニル-Fmocアミノエチル)フェノキシ樹脂などをあげることができる。このような樹脂を用い、 $\alpha$ -アミノ基と側鎖官能基を適当に保護したアミノ酸を、目的とするポリペプチドの配列通りに、自体公知の各種縮合方法に従い、樹脂上で縮合させる。反応の  
10 最後に樹脂からポリペプチドを切り出すと同時に各種保護基を除去し、さらに高希釈溶液中で分子内ジスルフィド結合形成反応を実施し、本発明のポリペプチドもしくはその塩または本発明のRF RPもしくはその塩を取得する。

上記した保護アミノ酸の縮合に関しては、ポリペプチド合成に使用できる各種活性化試薬を用いることができるが、特に、カルボジイミド類がよい。  
15 カルボジイミド類としては、DCC、N,N'-ジイソプロピルカルボジイミド、N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロリル)カルボジイミドなどが用いられる。これらによる活性化にはラセミ化抑制添加剤（例えば、HOBt, HOOBt）とともに保護アミノ酸を直接樹脂に添加するかまたは、対称酸無水物またはHOBtエステルあるいはHOOBtエステルとしてあらかじめ保護アミノ酸の活性化を行  
20 なった後に樹脂に添加することができる。

保護アミノ酸の活性化や樹脂との縮合に用いられる溶媒としては、ポリペプチド縮合反応に使用しうることが知られている溶媒から適宜選択されうる。例えば、N,N-ジメチルホルムアミド、N,N-ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドンなどの酸アミド類、塩化メチレン、クロロホルムなど  
25 のハロゲン化炭化水素類、トリフルオロエタノールなどのアルコール類、ジメチルスルホキシドなどのスルホキシド類、ピリジン、ジオキサン、テトラヒドロフランなどのエーテル類、アセトニトリル、プロピオニトリルなどのニトリル類、酢酸メチル、酢酸エチルなどのエステル類あるいはこれらの適宜の混合物などが用いられる。反応温度はポリペプチド結合形成反応に使用



され得ることが知られている範囲から適宜選択され、通常約 $-20^{\circ}\text{C}$ ～ $50^{\circ}\text{C}$ の範囲から適宜選択される。活性化されたアミノ酸誘導体は通常1.5～4倍過剰で用いられる。ニンヒドリン反応を用いたテストの結果、縮合が不十分な場合には保護基の脱離を行なうことなく縮合反応を繰り返すことにより十分な縮合を行なうことができる。反応を繰り返しても十分な縮合が得られないときには、無水酢酸またはアセチルイミダゾールを用いて未反応アミノ酸をアセチル化することによって、後の反応に影響を与えないようにすることができる。

原料のアミノ基の保護基としては、例えば、Z、Boc、*t*-ペンチルオキシカルボニル、イソボルニルオキシカルボニル、4-メトキシベンジルオキシカルボニル、Cl-Z、Br-Z、アダマンチルオキシカルボニル、トリフルオロアセチル、フタロイル、ホルミル、2-ニトロフェニルスルフェニル、ジフェニルホスフィノチオイル、Fmocなどが用いられる。

カルボキシ基は、例えば、アルキルエステル化（例えば、メチル、エチル、プロピル、ブチル、*t*-ブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロオクチル、2-アダマンチルなどの直鎖状、分枝状もしくは環状アルキルエステル化）、アラルキルエステル化（例えば、ベンジルエステル、4-ニトロベンジルエステル、4-メトキシベンジルエステル、4-クロロベンジルエステル、ベンズヒドリルエステル化）、フェナシルエステル化、ベンジルオキシカルボニルヒドラジド化、*t*-ブトキシカルボニルヒドラジド化、トリチルヒドラジド化などによって保護することができる。

セリンの水酸基は、例えば、エステル化またはエーテル化によって保護することができる。このエステル化に適する基としては、例えば、アセチル基などの低級（ $\text{C}_{1-6}$ ）アルカノイル基、ベンゾイル基などのアロイル基、ベンジルオキシカルボニル基、エトキシカルボニル基などの炭酸から誘導される基などが用いられる。また、エーテル化に適する基としては、例えば、ベンジル基、テトラヒドロピラニル基、*t*-ブチル基などである。

チロシンのフェノール性水酸基の保護基としては、例えば、Bzl、 $\text{Cl}_2$ -Bzl、2-ニトロベンジル、Br-Z、*t*-ブチルなどが用いられる。

ヒスチジンのイミダゾールの保護基としては、例えば、Tos、4-メトキシ-2,3,6-トリメチルベンゼンスルホニル、DNP、ベンジルオキシメチル、Bum、Boc、Trt、Fmocなどが用いられる。

- 原料のカルボキシル基の活性化されたものとしては、例えば、対応する酸  
5 無水物、アジド、活性エステル〔アルコール（例えば、ペンタクロロフェノール、2,4,5-トリクロロフェノール、2,4-ジニトロフェノール、シアノメチルアルコール、パラニトロフェノール、HONB、N-ヒドロキシスクシミド、N-ヒドロキシフタルイミド、HOBt）とのエステル〕などが用いられる。原料のアミノ基の活性化されたものとしては、例えば、対応するリン酸アミドが用  
10 いられる。

- 保護基の除去（脱離）方法としては、例えば、Pd-黒あるいはPd-炭素などの触媒の存在下での水素気流中での接触還元や、また、無水フッ化水素、メタンスルホン酸、トリフルオロメタンスルホン酸、トリフルオロ酢酸あるいはこれらの混合液などによる酸処理や、ジイソプロピルエチルアミン、ト  
15 リエチルアミン、ピペリジン、ピペラジンなどによる塩基処理、また液体アンモニア中ナトリウムによる還元なども用いられる。上記酸処理による脱離反応は、一般に約-20℃～40℃の温度で行なわれるが、酸処理においては、例えば、アニソール、フェノール、チオアニソール、メタクレゾール、パラクレゾール、ジメチルスルフィド、1,4-ブタンジチオール、1,2-エタンジチオールなどのようなカチオン捕捉剤の添加が有効である。また、ヒスチ  
20 ジンのイミダゾール保護基として用いられる2,4-ジニトロフェニル基はチオフェノール処理により除去され、トリプトファンのインドール保護基として用いられるホルミル基は上記の1,2-エタンジチオール、1,4-ブタンジチオールなどの存在下の酸処理による脱保護以外に、希水酸化ナトリウム溶液、希  
25 アンモニアなどによるアルカリ処理によっても除去される。

原料の反応に関与すべきでない官能基の保護ならびに保護基、およびその保護基の脱離、反応に関与する官能基の活性化などは公知の基または公知の手段から適宜選択しうる。

本発明のポリペプチドもしくはRF RPのアミド体を得る別の方法として

は、例えば、まず、カルボキシ末端アミノ酸の $\alpha$ -カルボキシル基をアミド化して保護した後、アミノ基側にペプチド（ポリペプチド）鎖を所望の鎖長まで延ばした後、該ペプチド鎖のN末端の $\alpha$ -アミノ基の保護基のみを除いたポリペプチドとC末端のカルボキシル基の保護基のみを除去したポリペプチドとを製造し、この両ポリペプチドを上記したような混合溶媒中で縮合させる。縮合反応の詳細については上記と同様である。縮合により得られた保護ポリペプチドを精製した後、上記方法によりすべての保護基を除去し、所望の粗ポリペプチドを得ることができる。この粗ポリペプチドは既知の各種精製手段を駆使して精製し、主要画分を凍結乾燥することで所望のポリペプチドもしくはRFRPのアミド体を得ることができる。

本発明のポリペプチドもしくはRFRPのエステル体を得るには、例えば、カルボキシ末端アミノ酸の $\alpha$ -カルボキシル基を所望のアルコール類と縮合しアミノ酸エステルとした後、ポリペプチドのアミド体と同様にして、所望のポリペプチドもしくはRFRPのエステル体を得ることができる。

本発明のRFRPまたはその塩は、自体公知のペプチドの合成法に従って、あるいは本発明のポリペプチドを適当なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。ペプチドの合成法としては、例えば、固相合成法、液相合成法のいずれによっても良い。すなわち、本発明のRFRPを構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを縮合させ、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的のペプチドを製造することができる。公知の縮合方法や保護基の脱離としては、例えば、以下の①～⑤に記載された方法があげられる。

①M. Bodanszky および M.A. Ondetti、ペプチド・シンセシス (Peptide Synthesis), Interscience Publishers, New York (1966年)

②SchroederおよびLuebke、ザ・ペプチド (The Peptide), Academic Press, New York (1965年)

③泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験、丸善(株) (1975年)

④矢島治明 および榊原俊平、生化学実験講座 1、タンパク質の化学IV、205、(1977年)

⑤矢島治明監修、続医薬品の開発、第14巻、ペプチド合成、広川書店

また、反応後は通常の前製法、例えば、溶媒抽出・蒸留・カラムクロマトグラフィー・液体クロマトグラフィー・再結晶などを組み合わせて本発明のRFRPを精製単離することができる。上記方法で得られるRFRPが遊離  
5 体である場合は、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって適当な塩に変換することができるし、逆に塩で得られた場合は、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって遊離体または他の塩に変換することができる。

本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドとしては、本発明のポリペプチドをコードする塩基配列（DNAまたはRNA、好ましくはDNA）を含有するものであればいかなるものであってもよい。該ポリヌクレオチドとしては、本発明のポリペプチドをコードするDNA、mRNA等のRNAであり、二本鎖であっても、一本鎖であってもよい。二本鎖の場合は、二本鎖DNA、二本鎖RNAまたはDNA:RNAのハイブリッドでもよい。一本鎖の場合は、センス鎖（即ち、コード鎖）であっても、アンチセンス鎖  
10 （即ち、非コード鎖）であってもよい。

本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを用いて、例えば、公知の実験医学増刊「新PCRとその応用」15(7)、1997記載の方法またはそれに準じた方法により、本発明のポリペプチドのmRNAを定量することができる。

20 本発明のポリペプチドをコードするDNAとしては、前述した本発明のポリペプチドをコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、前記した細胞・組織由来のcDNA、前記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。

25 ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、前記した細胞・組織よりtotalRNAまたはmRNA画分を調製したものをを用いて直接Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction（以下、RT-PCR法と略称する）によって増幅することもできる。

本発明のポリペプチドをコードするDNAとしては、例えば、配列番号：2、配列番号：9、配列番号：15、配列番号：19、配列番号：34または配列番号：51で表わされる塩基配列を含有するDNA、または配列番号：2、配列番号：9、配列番号：15、配列番号：19、配列番号：34または配列番号：51で表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を含有し、本発明のポリペプチドと実質的に同質の活性（例、細胞刺激活性など）を有するポリペプチドをコードするDNAなどであれば何れのものでもよい。

配列番号：2、配列番号：9、配列番号：15、配列番号：19、配列番号：34または配列番号：51で表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、それぞれ配列番号：2で表わされる塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、さらに好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

ハイブリダイゼーションは、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法、例えば、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning) 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。より好ましくは、ハイストリンジェントな条件に従って行なうことができる。

ハイストリンジェントな条件とは、例えば、ナトリウム濃度が約19～40 mM、好ましくは約19～20 mMで、温度が約50～70℃、好ましくは約60～65℃の条件を示す。特に、ナトリウム濃度が約19 mMで温度が約65℃の場合が最も好ましい。

より具体的には、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：2で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。また、配列番号：8で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：9で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用いられ、配列番号：14

で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：15で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用いられ、配列番号：18で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：19で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用いられ、配列番号：33で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：34で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用いられ、配列番号：50で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：51で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

- 5 DNAなどが用いられ、配列番号：33で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：34で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用いられ、配列番号：50で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：51で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。
- 10 本発明のRFRP-3をコードするポリヌクレオチドとしては、本発明のRFRP-3をコードする塩基配列（DNAまたはRNA、好ましくはDNA）を含有するものであればいかなるものであってもよい。該ポリヌクレオチドとしては、本発明のRFRP-3をコードするDNA、mRNA等のRNAであり、二本鎖であっても、一本鎖であってもよい。二本鎖の場合は、
- 15 二本鎖DNA、二本鎖RNAまたはDNA:RNAのハイブリッドでもよい。一本鎖の場合は、センス鎖（即ち、コード鎖）であっても、アンチセンス鎖（即ち、非コード鎖）であってもよい。

本発明のRFRP-3をコードするポリヌクレオチドを用いて、例えば、公知の実験医学増刊「新PCRとその応用」15(7)、1997記載の方法またはそれに準じた方法により、本発明のRFRP-3のmRNAを定量することができる。

- 20 本発明のRFRP-3をコードするDNAとしては、前述した本発明のRFRP-3をコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、前記した細胞・組織由来のcDNA、前記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。

本発明のRFRP-3をコードするDNAの具体的としては、  
①配列番号：1で表わされるアミノ酸配列の第104番目（Ala）～第131番目（Phe）のアミノ酸配列（配列番号：63）からなるペプチドをコードす

るDNA、またはこれらとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を含有するDNA、

②配列番号：1で表わされるアミノ酸配列の第101番目（Ser）～第131番目（Phe）のアミノ酸配列（配列番号：65）からなるペプチドをコードするDNA、またはこれらとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を含有するDNA、

③配列番号：14で表わされるアミノ酸配列の第104番目（Ala）～第131番目（Phe）のアミノ酸配列（配列番号：67）からなるペプチドをコードするDNA、またはこれらとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を含有するDNA、  
などがあげられる。

ハイストリンジェントな条件とは、例えば、ナトリウム濃度が約19～40 mM、好ましくは約19～20 mMで、温度が約50～70℃、好ましくは約60～65℃の条件を示す。特に、ナトリウム濃度が約19 mMで温度が約65℃の場合が最も好ましい。

より具体的には、

①配列番号：1で表わされるアミノ酸配列の第104番目（Ala）～第131番目（Phe）のアミノ酸配列（配列番号：63）からなるペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：2で表される塩基配列の第310番目ないし第393番目の塩基配列（配列番号：64）からなるDNA、

②配列番号：1で表わされるアミノ酸配列の第101番目（Ser）～第131番目（Phe）のアミノ酸配列（配列番号：65）からなるペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：2で表される塩基配列の第301番目ないし第393番目の塩基配列（配列番号：66）を含有するDNA、

③配列番号：14で表されるアミノ酸配列の第104番目（Ala）～第131番目（Phe）のアミノ酸配列（配列番号：67）からなるペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：15で表される塩基配列の第310番目～第393番目の塩基配列（配列番号：68）を含有するDNAなどがあげられる。

さらに、

- ④配列番号：1で表わされるアミノ酸配列の第125番目(Pro)ないし第131番目(Phe)のアミノ酸配列からなるペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：2の第373番目ないし第393番目の塩基配列からなるDNA、
- ⑤配列番号：1で表わされるアミノ酸配列の第126番目(Asn)ないし第131番目(Phe)のアミノ酸配列からなるペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：2の第376番目ないし第393番目の塩基配列からなるDNA、
- ⑥配列番号：1で表わされるアミノ酸配列の第127番目(Leu)ないし第131番目(Phe)のアミノ酸配列からなるペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：2の第379番目ないし第393番目の塩基配列からなるDNAなどがあげられる。

- 本発明のポリペプチドもしくはそのRFRP-3、後述の本発明のレセプター蛋白質もしくはそのRFRP-3およびこれらの蛋白質またはペプチドをコードするDNAは、自体公知の方法で標識化されていてもよく、具体的にはアイソトープラベル化されたもの、蛍光標識されたもの(例えば、フルオレセインなどによる蛍光標識)、ビオチン化されたものまたは酵素標識されたものなどがあげられる。
- 本発明のポリペプチドまたはRFRP-3(以下、これらポリペプチド等をコードするDNAのクローニングおよび発現の説明においては、これらポリペプチド等を単に本発明のポリペプチドと略記する場合がある)を完全にコードするDNAのクローニングの手段としては、本発明のポリペプチドの部分塩基配列を有する合成DNAプライマーを用いて自体公知のPCR法によって増幅するか、または適当なベクターに組み込んだDNAを本発明のポリペプチドの一部あるいは全領域をコードするDNA断片もしくは合成DNAを用いて標識したものとハイブリダイゼーションによって選別することができる。ハイブリダイゼーションの方法は、例えば、モレキュラー・クローニング(Molecular Cloning) 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor



Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。

DNAの塩基配列の変換は、公知のキット、例えば、Mutan<sup>TM</sup>-super Express Km (宝酒造(株))、Mutan<sup>TM</sup>-K (宝酒造(株))等を用いて、ODA-LA PCR法  
5 やGapped duplex法やKunkel法等の自公知の方法あるいはそれらに準じる方法に従って行なうことができる。

クローン化されたポリペプチドをコードするDNAは目的によりそのまま、または所望により制限酵素で消化したり、リンカーを付加したりして使用する  
10 ことができる。該DNAはその5'末端側に翻訳開始コドンとしてのATGを有し、また3'末端側には翻訳終止コドンとしてのTAA、TGAまたはTAGを有していてもよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適当な合成DNAアダプターを用いて付加することもできる。

本発明のポリペプチドの発現ベクターは、例えば、(イ)本発明のポリペ  
15 プチドをコードするDNAから目的とするDNA断片を切り出し、(ロ)該DNA断片を適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することにより製造することができる。

ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド(例、pBR322、pBR  
325、pUC12、pUC13)、枯草菌由来のプラスミド(例、pUB  
20 110、pTP5、pC194)、酵母由来プラスミド(例、pSH19、pSH15)、λファージなどのバクテリオファージ、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルスなどの動物ウイルスなどの他、pA1-11、pXT1、pRc/CMV、pRc/RSV、pcDNA1/Neoなどが用いられる。

25 本発明で用いられるプロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。例えば、動物細胞を宿主として用いる場合は、SR $\alpha$ プロモーター、SV40プロモーター、HIV・LTRプロモーター、CMVプロモーター、HSV-TKプロモーターなどがあげられる。

- これらのうち、CMV（サイトメガロウイルス）プロモーター、SR $\alpha$ プロモーターなどを用いるのが好ましい。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、trpプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、 $\lambda$  PLプロモーター、lppプロモーター、T7プロモーターなどが、宿主がバチルス属菌である場合は、SP $\phi$ 1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーターなど、宿主が酵母である場合は、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーターなどが好ましい。宿主が昆虫細胞である場合は、ポリヘドリンプロモーター、P10プロモーターなどが好ましい。
- 10 発現ベクターには、以上の他に、所望によりエンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、SV40複製オリジン（以下、SV40oriと略称する場合がある）などを含有しているものを用いることができる。選択マーカーとしては、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素（以下、dhfrと略称する場合がある）遺伝子〔メソトレキセート（MTX）
- 15 耐性〕、アンピシリン耐性遺伝子（以下、Amp<sup>r</sup>と略称する場合がある）、ネオマイシン耐性遺伝子（以下、Neo<sup>r</sup>と略称する場合がある、G418耐性）等があげられる。特に、dhfr遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞を用いてdhfr遺伝子を選択マーカーとして使用する場合、目的遺伝子をチミジンを含まない培地によっても選択できる。
- 20 また、必要に応じて、宿主に合ったシグナル配列を、本発明のポリペプチドのN端末側に付加する。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、PhoA・シグナル配列、OmpA・シグナル配列などが、宿主がバチルス属菌である場合は、 $\alpha$ -アミラーゼ・シグナル配列、サブチリシン・シグナル配列などが、宿主が酵母である場合は、MF $\alpha$ ・シグナル配列、SUC2・シグナル配列など、
- 25 宿主が動物細胞である場合には、インシュリン・シグナル配列、 $\alpha$ -インターフェロン・シグナル配列、抗体分子・シグナル配列などがそれぞれ利用できる。

このようにして構築された本発明のポリペプチドをコードするDNAを含有するベクターを用いて、形質転換体を製造することができる。

宿主としては、例えば、エシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、昆虫細胞、昆虫、動物細胞などが用いられる。

エシェリヒア属菌の具体例としては、例えば、エシェリヒア・コリ (Escherichia coli) K12・DH1 [プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 60巻, 160(1968)], JM103 [ヌクレック・アシズ・リサーチ, (Nucleic Acids Research), 9巻, 309(1981)], JA221 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (Journal of Molecular Biology)], 120巻, 517(1978)], HB101 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー, 41巻, 459(1969)], C600 [ジェネティックス (Genetics), 39巻, 440(1954)] などが用いられる。

バチルス属菌としては、例えば、バチルス・サブチルス (Bacillus subtilis) MI114 [ジーン, 24巻, 255(1983)], 207-21 [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (Journal of Biochemistry), 95巻, 87(1984)] などが用いられる。

酵母としては、例えば、サッカロマイセス セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae) AH22, AH22R<sup>-</sup>, NA87-11A, DKD-5D, 20B-12、シゾサッカロマイセス ポンベ (Schizosaccharomyces pombe) NCYC1913, NCYC2036、ピキア パストリス (Pichia pastoris) KM71 などが用いられる。

昆虫細胞としては、例えば、ウイルスがAcNPVの場合は、夜盗蛾の幼虫由来株化細胞 (Spodoptera frugiperda cell; Sf細胞)、Trichoplusia niの中腸由来のMG1細胞、Trichoplusia niの卵由来のHigh Five<sup>TM</sup>細胞、Mamestra brassicae由来の細胞またはEstigmena acrea由来の細胞などが用いられる。ウイルスがBmNPVの場合は、蚕由来株化細胞 (Bombyx mori N細胞; BmN細胞) などが用いられる。該Sf細胞としては、例えば、Sf9細胞 (ATCC CRL1711)、Sf21細胞 (以上、Vaughn, J.L.ら、イン・ヴィボ (In Vivo), 13, 213-217, (1977)) などが用いられる。

昆虫としては、例えば、カイコの幼虫などが用いられる〔前田ら、ネイチャー (Nature), 315巻, 592(1985)〕。

動物細胞としては、例えば、サル細胞COS-7, Vero, チャイニーズハムスター細胞CHO (以下、CHO細胞と略記), dhfr遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞CHO (以下、CHO (dhfr<sup>-</sup>)細胞と略記),  
5 マウスL細胞, マウスAtT-20, マウスミエローマ細胞, ラットGH3, ヒトFL細胞などが用いられる。

エシェリヒア属菌を形質転換するには、例えば、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユーエス  
10 エー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 69巻, 2110(1972)やジェーン (Gene), 17巻, 107(1982)などに記載の方法に従って行なうことができる。

バチルス属菌を形質転換するには、例えば、モレキュラー・アンド・ジェネラル・ジェネティクス (Molecular & General Genetics), 168巻,  
15 111(1979)などに記載の方法に従って行なうことができる。

酵母を形質転換するには、例えば、メソッズ・イン・エンザイモロジー (Methods in Enzymology), 194巻, 182-187(1991)、プロ  
シーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 75巻, 19  
20 29(1978)などに記載の方法に従って行なうことができる。

昆虫細胞または昆虫を形質転換するには、例えば、バイオ/テクノロジー (Bio/Technology, 6, 47-55(1988))などに記載の方法に従って行なうことができる。

動物細胞を形質転換するには、例えば、細胞工学別冊8 新細胞工学実験  
25 プロトコール, 263-267(1995) (秀潤社発行)、ヴィロロジー (Virology), 52巻, 456(1973)に記載の方法に従って行なうことができる。

このようにして、ポリペプチドをコードするDNAを含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体を得ることができる。

宿主がエシェリヒア属菌、バチルス属菌である形質転換体を培養する際、培養に使用される培地としては液体培地が適当であり、その中には該形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含有せしめられる。炭素源としては、例えば、グルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖など、窒素源としては、例えば、アンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンスチープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などの無機または有機物質、無機物としては、例えば、塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウムなどがあげられる。また、酵母エキス、ビタミン類、生長促進因子などを添加してもよい。培地のpHは約5〜8が望ましい。

エシェリヒア属菌を培養する際の培地としては、例えば、グルコース、カザミノ酸を含むM9培地〔ミラー (Miller) , ジャーナル・オブ・エクスぺリメンツ・イン・モレキュラー・ジェネティクス (Journal of Experiments in Molecular Genetics) , 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972〕が好ましい。ここに必要によりプロモーターを効率よく働かせるために、例えば、3β-インドリルアクリル酸のような薬剤を加えることができる。

宿主がエシェリヒア属菌の場合、培養は通常約15〜43℃で約3〜24時間行ない、必要により、通気や攪拌を加えることもできる。

宿主がバチルス属菌の場合、培養は通常約30〜40℃で約6〜24時間行ない、必要により通気や攪拌を加えることもできる。

宿主が酵母である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、パークホルダー (Burkholder) 最小培地〔Bostian, K. L. ら、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) , 77巻, 4505 (1980)〕や0.5%カザミノ酸を含有するSD培地〔Bitter, G. A. ら、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) , 81巻, 5330 (1984)〕があげられる。培地のpHは約5〜8に調整するのが好

ましい。培養は通常約20℃～35℃で約24～72時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

宿主が昆虫細胞または昆虫である形質転換体を培養する際、培地としては、Grace's Insect Medium (Grace, T. C. C., ネイチャー (Nature), 195, 788 (1962))  
5 に非動化した10%ウシ血清等の添加物を適宜加えたものなどが用いられる。培地のpHは約6.2～6.4に調整するのが好ましい。培養は通常約27℃で約3～5日間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、約5～20%の胎児牛血清を含むMEM培地 [サイエンス (Science), 12  
10 2巻, 501 (1952)], DMEM培地 [ヴィロロジー (Virology), 8巻, 396 (1959)], RPMI 1640培地 [ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・メディカル・アソシエーション (The Journal of the American Medical Association) 199巻, 519 (1967)], 199培地 [プロシー  
15 ジング・オブ・ザ・ソサイエティ・フォー・ザ・バイオロジカル・メディスン (Proceeding of the Society for the Biological Medicine), 73巻, 1 (1950)] などが用いられる。pHは約6～8であるのが好ましい。培養は通常約30℃～40℃で約15～60時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

20 以上のようにして、形質転換体の細胞膜などに本発明のポリペプチドを生成せしめることができる。

上記培養物から本発明のポリペプチドを分離精製するには、例えば、下記の方法により行なうことができる。

本発明のポリペプチドを培養菌体あるいは細胞から抽出するに際しては、培養後、公知の方法で菌体あるいは細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁  
25 し、超音波、リゾチームおよび／または凍結融解などによって菌体あるいは細胞を破壊したのち、遠心分離やろ過によりポリペプチドの粗抽出液を得る方法などが適宜用いられる。緩衝液の中に尿素や塩酸グアニジンなどの蛋白質変性剤や、トリトンX-100<sup>TM</sup>などの界面活性剤が含まれていてもよい。培養液中にポリペプチドが分泌される場合には、培養終了後、それ自体公知

の方法で菌体あるいは細胞と上清とを分離し、上清を集める。

- このようにして得られた培養上清、あるいは抽出液中に含まれるポリペプチドの精製は、自体公知の分離・精製法を適宜組み合わせて行なうことができる。これらの公知の分離、精製法としては、塩析や溶媒沈澱法などの溶解度を利用する方法、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、およびSDS-ポリ
- 5 アクリルアミドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法な
- 10 どの等電点の差を利用する方法などが用いられる。

かくして得られるポリペプチドが遊離体で得られた場合には、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法によって塩に変換することができ、逆に塩で得られた場合には自体公知の方法あるいはそれに準じる方法により、遊離体または他の塩に変換することができる。

- 15 なお、組換え体が産生するポリペプチドを、精製前または精製後に適当な蛋白修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり、ポリペプチドを部分的に除去することもできる。蛋白修飾酵素としては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、アルギニルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グリコシダーゼなどが用いられる。
- 20 かくして生成する本発明のポリペプチドまたはその塩の存在または活性は、標識したリガンドとの結合実験および特異抗体を用いたエンザイムイムノアッセイなどにより測定することができる。

- 本発明のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、発明のRFRP-3もしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の受容体（以下、本発明のレセプター蛋白質と略記する場合がある）
- 25 として具体的には、例えば、配列番号：37で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するレセプター蛋白質（OT7T022）などがあげられる。

本発明で使用するレセプター蛋白質（以下、本発明のレセプタータンパク

- 質)は、例えば、哺乳動物(例えば、ヒト、モルモット、ラット、マウス、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サルなど)のあらゆる細胞(例えば、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、膵臓β細胞、骨髄細胞、メサングウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、内皮細胞、繊維芽細胞、繊維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞(例、マクロファージ、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球)、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞、肝細胞もしくは間質細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくはガン細胞など)や血球系の細胞、またはそれらの細胞が存在するあらゆる組織、例えば、脳、
- 5 脳の各部位(例、嗅球、扁桃核、大脳基底核、海馬、視床、視床下部、視床下核、大脳皮質、延髄、小脳、後頭葉、前頭葉、側頭葉、被殻、尾状核、脳染、黒質)、脊髄、下垂体、胃、膵臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髄、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管(例、大腸、小腸)、血管、心臓、胸腺、脾臓、顎下腺、末梢血、末梢血球、前立腺、睾丸、精巣、卵巣、胎盤、
- 10 子宮、骨、関節、骨格筋など(特に、脳や脳の各部位)に由来する蛋白質であつてもよく、また合成蛋白質であつてもよい。
- 15

配列番号：37で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、例えば、配列番号：37で表わされるアミノ酸配列と約50%以上、好ましくは約70%以上、より好ましくは約80%以上、さらに好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。

20

配列番号：37で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質としては、例えば、配列番号：37で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、配列番号：37で表わされる

25 アミノ酸配列を含有する蛋白質と実質的に同質の活性を有する蛋白質などが好ましく、具体的には、配列番号：54で表されるアミノ酸配列を含有する蛋白質などがあげられる。

実質的に同質の活性としては、例えば、リガンド結合活性またはシグナル情報伝達作用などが挙げられる。実質的に同質とは、それらの活性が性質的



に同質であることを示す。したがって、リガンド結合活性またはシグナル情報伝達作用などの活性が同等（例、約0.01～100倍、好ましくは約0.5～20倍、より好ましくは約0.5～2倍）であることが好ましいが、これらの活性の程度や蛋白質の分子量などの量的要素は異なってもよい。

- 5      リガンド結合活性またはシグナル情報伝達作用などの活性の測定は、自体公知の方法に準じて行なうことができるが、例えば、後述するリガンドの決定方法やスクリーニング方法に従って測定することができる。

- また、本発明のレセプター蛋白質としては、①配列番号：37または配列番号：54で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、  
10      1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（1または2個））のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、②配列番号：37または配列番号：54で表わされるアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（1または2個））のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、③配列番号：3  
15      7または配列番号：54で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（1または2個））のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または④それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有する蛋白質なども用いられる。

- 20      本明細書におけるレセプター蛋白質は、ペプチド標記の慣例に従って左端がN末端（アミノ末端）、右端がC末端（カルボキシル末端）である。配列番号：37で表わされるアミノ酸配列を含有するレセプター蛋白質をはじめとする、本発明で使用するレセプター蛋白質は、C末端がカルボキシル基（-COOH）、カルボキシレート（-COO<sup>-</sup>）、アミド（-CONH<sub>2</sub>）または  
25      エステル（-COOR）何れであってもよい。

ここでエステルにおけるRとしては、例えば、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピルもしくはn-ブチルなどのC<sub>1-6</sub>アルキル基、例えば、シクロペンチル、シクロヘキシルなどのC<sub>3-8</sub>シクロアルキル基、例えば、フェニル、α-ナフチルなどのC<sub>6-12</sub>アリール基、例えば、ベンジル、フェネチ

ルなどのフェニル-C<sub>1-2</sub>アルキル基もしくは $\alpha$ -ナフチルメチルなどの $\alpha$ -ナフチル-C<sub>1-2</sub>アルキル基などのC<sub>7-14</sub>アラルキル基のほか、経口用エステルとして汎用されるピパロイルオキシメチル基などが用いられる。

5 本発明のレセプター蛋白質がC末端以外にカルボキシル基（またはカルボキシレート）を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているものも本発明のレセプター蛋白質に含まれる。この場合のエステルとしては、例えば上記したC末端のエステルなどが用いられる。

さらに、本発明のレセプター蛋白質には、上記したポリペプチドにおいて、N末端のメチオニン残基のアミノ基が保護基（例えば、ホルミル基、アセチルなどのC<sub>2-6</sub>アルカノイル基などのC<sub>1-6</sub>アシル基など）で保護されているもの、N端側が生体内で切断され生成したグルタミル基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基（例えば、-OH、-SH、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基など）が適当な保護基（例えば、ホルミル基、アセチルなどのC<sub>2-6</sub>アルカノイル基などのC<sub>1-6</sub>アシル基など）で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖蛋白質などの複合蛋白質なども含まれる。

20 本発明のレセプター蛋白質の具体例としては、例えば、配列番号：37で表わされるアミノ酸配列からなるラット由来のレセプター蛋白質、配列番号：54で表わされるアミノ酸配列からなるヒト由来のレセプター蛋白質などが用いられる。

本発明のレセプター蛋白質の部分ペプチドとしては、前記したレセプター蛋白質の部分ペプチドであれば何れのものであってもよいが、例えば、本発明のレセプター蛋白質分子のうち、細胞膜の外に露出している部位であって、レセプター結合活性を有するものなどが用いられる。

25 具体的には、配列番号：37または配列番号：54で表わされるアミノ酸配列を含有するレセプター蛋白質の部分ペプチドとしては、疎水性プロット解析において細胞外領域（親水性（Hydrophilic）部位）であると分析された部分を含むペプチドである。また、疎水性（Hydrophobic）部位を一部に含むペプチドも同様に用いることができる。個々のドメインを個別に含むペプチ

ドも用い得るが、複数のドメインを同時に含む部分のペプチドでも良い。

本発明のレセプター蛋白質の部分ペプチドのアミノ酸の数は、前記したレセプター蛋白質の構成アミノ酸配列のうち少なくとも20個以上、好ましくは50個以上、より好ましくは100個以上のアミノ酸配列を含有するペプチドなどが好ましい。

実質的に同一のアミノ酸配列とは、これらアミノ酸配列と約50%以上、好ましくは約70%以上、より好ましくは約80%以上、さらに好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列を示す。

10      ここで、「実質的に同質の活性」とは、前記と同意義を示す。「実質的に同質の活性」の測定は前記と同様に行なうことができる。

また、本発明のレセプター蛋白質の部分ペプチドは、上記アミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～10個程度、さらに好ましくは数個（1または2個））のアミノ酸が欠失し、または、そのアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～20個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（1または2個））のアミノ酸が付加し、または、そのアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～10個程度、より好ましくは数個（1または2個））のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されていてもよい。

20      また、本発明のレセプター蛋白質の部分ペプチドはC末端がカルボキシル基（ $-\text{COOH}$ ）、カルボキシレート（ $-\text{COO}^-$ ）、アミド（ $-\text{CONH}_2$ ）またはエステル（ $-\text{COOR}$ ）（Rは上記と同意義を示す）の何れであってもよい。

25      本発明のレセプター蛋白質の部分ペプチドがC末端以外にカルボキシル基（またはカルボキシレート）を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているものもレセプター蛋白質に含まれる。この場合のエステルとしては、例えば上記したC末端のエステルなどが用いられる。

さらに、本発明のレセプター蛋白質の部分ペプチドには、前記したレセプター蛋白質と同様に、N末端のメチオニン残基のアミノ基が保護基で保護さ

れているもの、N端側が生体内で切断され生成したGlnがピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基が適当な保護基で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖ペプチドなどの複合ペプチドなども含まれる。

- 5       本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの塩としては、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼン
- 10       スルホン酸）との塩などが用いられる。

- 本発明のレセプター蛋白質またはその塩は、前述したヒトや哺乳動物の細胞または組織から自体公知のレセプター蛋白質の精製方法によって製造することもできるし、後述する本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAを含有する形質転換体（宿主は前述の本発明のポリペプチドをコードするDNA
- 15       Aを含有する形質転換体の宿主と同様のものなどが用いられる。）を前述の本発明のポリペプチドをコードするDNAを含有する形質転換体の作製方法に準じて作製し、前述の本発明のポリペプチドをコードするDNAを含有する形質転換体の培養方法に準じて培養することによっても製造することができる。また、前述のポリペプチド合成法またはこれに準じて製造することも
- 20       できる。

      ヒトや哺乳動物の組織または細胞から製造する場合、ヒトや哺乳動物の組織または細胞をホモジナイズした後、酸などで抽出を行ない、該抽出液を逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーなどのクロマトグラフィーを組み合わせることにより精製単離することができる。

- 25       本発明のレセプター蛋白質の部分ペプチドまたはその塩は、前述の自体公知のペプチドの合成法に従って、あるいは本発明のレセプター蛋白質を適当なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。

      本発明のレセプター蛋白質またはその塩、その部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の合成は上述の本発明のポリペプ

チドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩における合成方法と同様の方法により合成することができる。

本発明のレセプター蛋白質をコードするポリヌクレオチドとしては、本発明のレセプター蛋白質をコードする塩基配列（DNAまたはRNA、好ましくはDNA）を含有するものであればいかなるものであってもよい。該ポリヌクレオチドとしては、本発明のレセプター蛋白質をコードするDNA、mRNA等のRNAであり、二本鎖であっても、一本鎖であってもよい。二本鎖の場合は、二本鎖DNA、二本鎖RNAまたはDNA：RNAのハイブリッドでもよい。一本鎖の場合は、センス鎖（即ち、コード鎖）であっても、アンチセンス鎖（即ち、非コード鎖）であってもよい。

本発明のレセプター蛋白質をコードするポリヌクレオチドを用いて、例えば、公知の実験医学増刊「新PCRとその応用」15(7)、1997記載の方法またはそれに準じた方法により、本発明のレセプター蛋白質のmRNAを定量することができる。

本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAとしては、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、前記した細胞・組織由来のcDNA、前記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、前記した細胞・組織よりtotalRNAまたはmRNA画分を調製したものをを用いて直接Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction（以下、RT-PCR法と略称する）によって増幅することもできる。

具体的には、本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAとしては、例えば、配列番号：38、配列番号：55または配列番号：56で表わされる塩基配列を含有するDNA、または配列番号：38、配列番号：55または配列番号：56で表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を含有し、本発明のレセプター蛋白質と実質的に同質の活性（例、リガンド結合活性、シグナル情報伝達作用など）を有するレセプター蛋白質をコードするDNAであれば何れのものでもよい。

配列番号：３８、配列番号：５５または配列番号：５６で表わされる塩基配列とハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号：３８、配列番号：５５または配列番号：５６で表わされる塩基配列と約７０％以上、好ましくは約８０％以上、より好ましくは約９０％以上、最も好ましくは約  
5 ９５％以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

ハイブリダイゼーションは、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法、例えば、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning) 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。より好ましくは、ハイ  
10 ストリンジェントな条件に従って行なうことができる。

該ハイストリンジェントな条件とは、例えば、ナトリウム濃度が約１９～４０mM、好ましくは約１９～２０mMで、温度が約５０～７０℃、好ましくは約６０～６５℃の条件を示す。特に、ナトリウム濃度が約１９mMで温  
15 度が約６５℃の場合が最も好ましい。

配列番号：３８、配列番号：５５または配列番号：５６で表わされる塩基配列とハイブリダイズできるDNAでコードされるポリペプチドは上述の本発明のポリペプチドの製造法と同様にして製造することができ、該ポリペプチドのアミド、エステル、塩は上述の本発明のポリペプチドのアミド、エス  
20 テル、塩と同様のものなどがあげられる。

より具体的には、配列番号：３７で表わされるアミノ酸配列からなるレセプター蛋白質をコードするDNAとしては、配列番号：３８で表わされる塩基配列からなるDNAなどが用いられ、配列番号：５４で表わされるアミノ酸配列からなるレセプター蛋白質をコードするDNAとしては、配列番号：  
25 ５５または配列番号：５６で表わされる塩基配列からなるDNAなどが用いられる。

本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAの塩基配列の一部、または該DNAと相補的な塩基配列の一部を含有してなるポリヌクレオチドとは、下記の本発明の部分ペプチドをコードするDNAを包含するだけでなく、

RNAをも包含する意味で用いられる。

本発明のレセプター蛋白質の部分ペプチドをコードするDNAとしては、前述した本発明の部分ペプチドをコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、前記した細胞・組織由来のcDNA、前記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、前記した細胞・組織よりmRNA画分を調製したものをを用いて直接Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction(以下、RT-PCR法と略称する)によって増幅することもできる。

具体的には、本発明の部分ペプチドをコードするDNAとしては、例えば、(1)配列番号：38、配列番号：55または配列番号：56で表わされる塩基配列を含有するDNAの部分塩基配列を含有するDNA、または(2)配列番号：38、配列番号：55または配列番号：56で表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、本発明のレセプター蛋白質と実質的に同質の活性(例、リガンド結合活性またはシグナル情報伝達作用など)を有するレセプター蛋白質をコードするDNAの部分塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

本発明のRFRP-3に対する抗体(以下、単に本発明の抗体と称する場合がある)は、本発明のRFRP-3に対する抗体を認識し得る抗体であれば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体の何れであってもよい。

本発明のRFRP-3に対する抗体は、本発明のRFRP-3を抗原として用い、自体公知の抗体または抗血清の製造法に従って製造することができる。

#### 25 [モノクローナル抗体の作製]

##### (a) モノクローナル抗体産生細胞の作製

本発明のRFRP-3は、温血動物に対して投与により抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントア

ジュバントを投与してもよい。投与は通常2～6週毎に1回ずつ、計2～10回程度行われる。用いられる温血動物としては、例えば、サル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギ、ニワトリがあげられるが、マウスおよびラットが好ましく用いられる。

- 5       モノクローナル抗体産生細胞の作製に際しては、抗原で免疫された温血動物、例えばマウスから抗体価の認められた個体を選択し最終免疫の2～5日後に脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を同種または異種動物の骨髄腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することができる。抗血清中の抗体価の測定は、例
- 10       例えば、後記の標識化ペプチドと抗血清とを反応させたのち、抗体に結合した標識剤の活性を測定することにより行なうことができる。融合操作は既知の方法、例えば、ケーラーとミルスタインの方法〔ネイチャー (Nature)、256、495 (1975)〕に従い実施することができる。融合促進剤としては、例えば、ポリエチレングリコール (PEG) やセンダイウィルスなどがあげられるが、
- 15       好ましくはPEGが用いられる。

- 骨髄腫細胞としては、例えば、NS-1、P3U1、SP2/0、AP-1などの温血動物の骨髄腫細胞があげられるが、P3U1が好ましく用いられる。用いられる抗体産生細胞（脾臓細胞）数と骨髄腫細胞数との好ましい比率は1：1～20：1程度であり、PEG（好ましくはPEG1000～
- 20       PEG6000）が10～80％程度の濃度で添加され、20～40℃、好ましくは30～37℃で1～10分間インキュベートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。

- モノクローナル抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングには種々の方法が使用できるが、例えば、RFRP-3抗原を直接あるいは担体とともに吸
- 25       着させた固相（例、マイクロプレート）にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射性物質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体（細胞融合に用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体が用いられる）またはプロテインAを加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法、抗免疫グロブリン抗体またはプロテインAを吸着させた固相にハイブ



リドーマ培養上清を添加し、放射性物質や酵素などで標識したペプチドを加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法などがあげられる。

- モノクローナル抗体の選別は、自体公知あるいはそれに準じる方法に従って行なうことができる。通常HAT（ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン）を添加した動物細胞用培地で行なうことができる。選別および育種用培地としては、ハイブリドーマが生育できるものならばどのような培地を用いても良い。例えば、1～20%、好ましくは10～20%の牛胎児血清を含むRPMI 1640培地、1～10%の牛胎児血清を含むGIT培地（和光純薬工業（株））あるいはハイブリドーマ培養用無血清培地（SFM-101、日水製薬（株））などを用いることができる。培養温度は、通常20～40℃、好ましくは約37℃である。培養時間は、通常5日～3週間、好ましくは1週間～2週間である。培養は、通常5%炭酸ガス下で行なうことができる。ハイブリドーマ培養上清の抗体価は、上記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。

15 (b) モノクローナル抗体の精製

- モノクローナル抗体の分離精製は、自体公知の方法、例えば、免疫グロブリンの分離精製法〔例、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換体（例、DEAE）による吸脱着法、超遠心法、ゲルろ過法、抗原結合固相あるいはプロテインAあるいはプロテインGなどの活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法〕に従って行なうことができる。

〔ポリクローナル抗体の作製〕

- 本発明のポリクローナル抗体は、それ自体公知あるいはそれに準じる方法に従って製造することができる。例えば、免疫抗原（RFRP-3抗原）自体、あるいはそれとキャリアー蛋白質との複合体をつくり、上記のモノクローナル抗体の製造法と同様に温血動物に免疫を行ない、該免疫動物から本発明のペプチドに対する抗体含有物を採取して、抗体の分離精製を行なうことにより製造することができる。

温血動物を免疫するために用いられる免疫抗原とキャリアー蛋白質との複

合体に関し、キャリアー蛋白質の種類およびキャリアーとハプテンとの混合比は、キャリアーに架橋させて免疫したハプテンに対して抗体が効率良くできれば、どのようなものをどのような比率で架橋させてもよいが、例えば、ウシ血清アルブミンやウシサイログロブリン、ヘモシアニン等を重量比でハプテン1に対し、約0.1～20、好ましくは約1～5の割合でカプルさせる方法が用いられる。

また、ハプテンとキャリアーのカプリングには、種々の縮合剤を用いることができるが、グルタルアルデヒドやカルボジイミド、マレイミド活性エステル、チオール基、ジチオビリジル基を含有する活性エステル試薬等が用いられる。

縮合生成物は、温血動物に対して、抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は、通常約2～6週毎に1回ずつ、計約3～10回程度行なわれる。

ポリクローナル抗体は、上記の方法で免疫された温血動物の血液、腹水など、好ましくは血液から採取することができる。

抗血清中のポリクローナル抗体価の測定は、上記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。ポリクローナル抗体の分離精製は、上記のモノクローナル抗体の分離精製と同様の免疫グロブリンの分離精製法に従って行なうことができる。

本発明のRF R P-3をコードするDNA（以下、これらのDNAを本発明のDNAと略記する場合がある）に相補的な、または実質的に相補的な塩基配列を有するアンチセンスDNA（以下、これらのDNAをアンチセンスDNAと略記する場合がある）としては、本発明のDNAに相補的な、または実質的に相補的な塩基配列を有し、該DNAの発現を抑制し得る作用を有するものであれば、いずれのアンチセンスDNAであってもよい。

本発明のDNAに実質的に相補的な塩基配列とは、例えば、本発明のDNAに相補的な塩基配列（すなわち、本発明のDNAの相補鎖）の全塩基配列

あるいは部分塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列などがあげられる。特に、本発明のDNAの相補鎖の全塩基配列うち、本発明のRFRP-3のN末端部位をコードする部分の塩基配列（例えば、開始コドン付近の塩基配列など）の相補鎖と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアンチセンスDNAが好適である。これらのアンチセンスDNAは、公知のDNA合成装置などを用いて製造することができる。

（1）本発明のRFRP-3が関与する各種疾病の予防・治療剤

10 本発明のRFRP-3もしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩（以下、これらを単に本発明のRFRP-3と略称することもある）は、プロラクチン分泌の調節作用、つまりプロラクチン分泌の促進および抑制作用を有する。すなわち、本発明のRFRP-3は、プロラクチン分泌の促進作用を有するため、プロラクチン分泌不全に関係する各種疾患の予防・治療薬などの医薬として有用である。

一方、本発明のRFRP-3は、本発明のレセプター蛋白質との親和性が強いと、投与量が増えるとプロラクチン分泌に対し脱感作（desensitization）が起こる結果、プロラクチン分泌を抑制する作用も有する。この場合、本発明のRFRP-3は、プロラクチン過剰分泌に関係する各種疾患の予防・治療薬として用いることができる。

20 従って、本発明のRFRP-3は、プロラクチン分泌促進剤として、卵巣機能低下症、精嚢発育不全、骨粗鬆症、更年期障害、乳汁分泌不全、甲状腺機能低下、腎不全などのプロラクチン分泌に関係する各種疾患の予防・治療薬として有用である。

25 さらに、本発明のRFRP-3は、プロラクチン分泌促進作用に基づき、性欲促進作用（フェロモンの作用）を有するため、性欲促進剤としても有用である。

また、本発明のRFRP-3は、プロラクチン分泌抑制剤として、高プロラクチン血症、下垂体腺腫瘍、間脳腫瘍、月経異常、ストレス、自己免疫疾

患、プロラクチノーマ、不妊症、インポテンス、無月経症、乳汁漏症、末端肥大症、キアリ・フロンメル (Chiari-Frommel) 症候群、アルゴンツ・デル・カステイロ (Argonz-del Castilo) 症候群、フォーベス・アルブライト

- (Forbes-Albright) 症候群、乳癌リンパ腫またはシーハン症候群または精子  
5 形成異常などのプロラクチン分泌に関係する各種疾患の予防および治療薬として有用である。

また、本発明の R F R P - 3 は、プロラクチン分泌抑制作用に基づいて、避妊薬としても有用である。

- その他、本発明の R F R P - 3 は、プロラクチン分泌機能を調べるための  
10 検査薬としても、また、ウシ、ヤギ、ブタなどの哺乳動物の乳汁の分泌促進剤などの動物薬としても有用であり、さらには該哺乳動物体内で有用物質を生産させ、これをその乳汁中への分泌することによる有用物質生産などへの応用も期待される。

- さらにまた、本発明の R F R P - 3 は、胎盤機能調節作用を有するため、  
15 絨毛癌、胎状奇胎、侵入奇胎、流産、胎児の発育不全、糖代謝異常、脂質代謝異常または分娩誘発の予防または治療薬としても有用である。

- 本発明の R F R P - 3 のプロラクチン分泌調節活性については、  
Neuroendocrinology, 62巻 1995年 198-206頁、または、Neuroscience Letters  
203巻 1996年 164-170頁などに記載の方法またはそれに準じた方法により行  
20 うことができ、後述の実施例に記載した方法で行うことが望ましい。

さらに、本発明の R F R P - 3 は、痛みを誘発する作用を有しており、痛覚障害の予防または治療薬としても有用である。

- 本発明の R F R P - 3 を前述の医薬または動物薬として使用する場合は、常套手段に従って実施すればよい。例えば、必要に応じて糖衣を施した錠剤、  
25 カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、該 R F R P - 3 またはその塩を生理学的に認められる担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製薬実施に要求される

単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な用量が得られるようにするものである。

- 錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えばゼラチン、コーンスターチ、トラガントガム、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、前記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施にしたがって処方することができる。

- 注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などが挙げられ、適当な溶解補助剤、例えばアルコール（例えば、エタノール）、ポリアルコール（例えばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン性界面活性剤（例えばポリソルベート 80 (TM)、HCO-50）などと併用してもよい。油性液としてはゴマ油、大豆油などがあげられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。また、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などと配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに無菌的に充填される。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば哺乳動物（例えば、ヒト、マウス、ラット、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サル、マントヒヒ、チンパンジーなど）に対して投与する

ことができる。

本発明のRFRP-3の投与量は、症状などにより差異はあるが、経口投与する場合、一般的に成人の甲状腺機能低下症患者（体重60kgに対し）においては、一日につき通常約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mgである。非経口的に投与する場合は、その1回の投与量は投与対象、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば注射剤の形では成人の甲状腺機能低下症患者（体重60kgに対し）においては、一日につき通常約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を静脈注射により投与すればよい。他の動物の場合も、体重60kgあたりに換算した量を投与することができる。

（2）本発明のRFRP-3の活性を促進または抑制する化合物またはその塩のスクリーニング方法

本発明のRFRP-3を用いることを特徴とする、本発明のRFRP-3の活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法は、好ましくは、本発明のRFRP-3、および本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩（以下、本発明のレセプター蛋白質と略称することもある）を用いることを特徴とする、発明のRFRP-3の活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法である。

該スクリーニング方法は、具体的には、（i）本発明のRFRP-3に本発明のレセプター蛋白質を接触させた場合と、（ii）本発明のRFRP-3に本発明のレセプター蛋白質および試験化合物を接触させた場合における、本発明のRFRP-3の活性を測定し、比較することにより行われる。

具体的には、上記スクリーニング方法においては、例えば、（i）と（ii）の場合における、本発明のRFRP-3および試験化合物の細胞刺激活性または本発明のRFRP-3および試験化合物の本発明のレセプター蛋白質に対する結合量などを測定して、比較することを特徴とするものである。

本発明のRFRP-3の細胞刺激活性などは、自体公知の方法、例えば、

Dockray, G.J. et al., Nature, 305, 328-330, 1983, Fukusumi, S., et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 232, 157-163, 1997, Hinuma, S., et al., Nature, 393, 272-276, 1998, Tatemoto, K., et al. Biochem. Biophys. Res. Commun., 251, 471-476, 1998. などに記載の方法あるいは  
5 それに準じる方法などに従って測定することができる。

本発明の R F R P - 3 および試験化合物の本発明のレセプター蛋白質に対する結合量の測定、細胞刺激活性の測定後述の方法またはそれらに準じた方法により行うことができる。

試験化合物としては、例えば、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、  
10 合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などがあげられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

上記のスクリーニング方法を実施するには、本発明の R F R P - 3 を、スクリーニングに適したバッファーに懸濁することにより本発明の R F R P -  
15 3 の標品を調製する。バッファーには、p H 約 4 ~ 1 0 (望ましくは、p H 約 6 ~ 8) のリン酸バッファー、トリス-塩酸バッファーなどの、本発明の R F R P - 3 と本発明のレセプター蛋白質との反応を阻害しないバッファーであればいずれでもよい。

例えば、上記 (ii) の場合における細胞刺激活性などが上記 (i) の場合に比べて、約 2 0 % 以上、好ましくは約 3 0 % 以上、より好ましくは約 5 0 %  
20 以上上昇させる試験化合物を本発明の R F R P - 3 の細胞刺激活性などを促進する化合物として、一方、上記 (ii) の場合における細胞刺激活性などが上記 (i) の場合に比べて、約 2 0 % 以上、好ましくは約 3 0 % 以上、より好ましくは約 5 0 % 以上阻害する試験化合物を本発明の R F R P - 3 の細胞  
25 刺激活性などを阻害する化合物として選択することができる。

また、これらの試験を行う前に、後述の「本発明の R F R P - 3 および試験化合物の本発明のレセプター蛋白質に対する結合量の測定」に記載した①~③の方法またはそれに準じた方法により試験を行い、試験化合物が本発明のレセプター蛋白質に結合することを確認することが好ましい。

さらに、上記の試験化合物が本発明のRFRP-3の活性を促進または阻害する化合物またはその塩であることを判断する一つの指標としては、本発明のRFRP-3および試験化合物の本発明のレセプター蛋白質に対する結合量と本発明のRFRP-3の標識体との結合を阻害する活性があげられる。

- 5 例えば, Hosoya, M. et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 194(1), 133-143, 1993に記載されているような結合試験系において、 $1 \times 10^{-2}$ M以下の濃度で標識体の結合を10%以上阻害する試験化合物は本発明のRFRP-3の活性を促進または阻害する化合物またはその塩である可能性が高いと考えられる。但し、結合阻害活性は標識体の結合をもとに測定した相対的な値であるため、上記の試験化合物が本発明のRFRP-3の活性を促進または阻害する化合物またはその塩であることを判断する上で必須ではない。

- 10 本発明のスクリーニング用キットは、本発明のRFRP-3を含有するものである。本発明のスクリーニング用キットは本発明のRFRP-3の受容体、即ち、本発明のレセプター蛋白質（具体的には、配列番号：37で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質またはその塩、またはその部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩）をさらに含有するものが好ましい。

本発明のスクリーニング用キットの例としては、次のものが挙げられる。

#### 1. スクリーニング用試薬

- 20 ①測定用緩衝液および洗浄用緩衝液

Hanks' Balanced Salt Solution（ギブコ社製）に、0.05%のウシ血清アルブミン（シグマ社製）を加えたもの。

孔径0.45  $\mu$ mのフィルターで濾過滅菌し、4℃で保存するか、あるいは用時調製しても良い。

- 25 ②レセプター標品

本発明のレセプター蛋白質を発現させたCHO細胞を、12穴プレートに $5 \times 10^5$ 個/穴で継代し、37℃、5%CO<sub>2</sub>、95%airで2日間培養したもの。

- ③標識リガンド



市販の [ $^3\text{H}$ ]、 [ $^{125}\text{I}$ ]、 [ $^{14}\text{C}$ ]、 [ $^{35}\text{S}$ ] など標識した本発明の RFRP-3 の水溶液の状態のものを  $4^\circ\text{C}$  あるいは  $-20^\circ\text{C}$  にて保存し、用時に測定用緩衝液にて  $1\ \mu\text{M}$  に希釈する。

#### ④リガンド標準液

- 5 本発明の RFRP-3 を  $0.1\%$  ウシ血清アルブミン（シグマ社製）を含む PBS で  $1\text{mM}$  となるように溶解し、 $-20^\circ\text{C}$  で保存する。

#### 2. 測定法

- ① 12穴組織培養用プレートにて培養した本発明のレセプター蛋白質発現 CHO 細胞を、測定用緩衝液  $1\text{ml}$  で2回洗浄した後、 $490\ \mu\text{l}$  の測定用緩衝液を各穴に加える。
- 10 ②  $10^{-8} \sim 10^{-10}\text{M}$  の試験化合物溶液を  $5\ \mu\text{l}$  加えた後、標識リガンドを  $5\ \mu\text{l}$  加え、室温にて1時間反応させる。非特異的結合量を知るためには試験化合物の代わりに  $10^{-8}\text{M}$  のリガンドを  $5\ \mu\text{l}$  加えておく。
- ③ 反応液を除去し、 $1\text{ml}$  の洗浄用緩衝液で3回洗浄する。細胞に結合した
- 15 標識リガンドを  $0.2\text{N NaOH}-1\%\text{SDS}$  で溶解し、 $4\text{ml}$  の液体シンチレーター A（和光純薬製）と混合する。
- ④ 液体シンチレーションカウンター（ベックマン社製）を用いて放射活性を測定し、Percent Maximum Binding (PMB) を次の式〔数1〕で求める。

〔数1〕

$$20 \quad \text{PMB} = [ (B - \text{NSB}) / (B_0 - \text{NSB}) ] \times 100$$

PMB : Percent Maximum Binding

B : 検体を加えた時の値

NSB : Non-specific Binding (非特異的結合量)

$B_0$  : 最大結合量

- 25 本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩は、上記した試験化合物、例えば、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などから選ばれた化合物であり、本発明の RFRP-3 の活性（例、細胞刺激活性など）を促進または阻害する化合物であ

る。

該化合物の塩としては、前記した本発明のRFRP-3の塩と同様のものが用いられる。

5 (3) 本発明のRFRP-3または試験化合物の本発明のレセプター蛋白質に対する結合量・細胞刺激活性の測定法

本発明のレセプター蛋白質を用いるか、または組換え型レセプター蛋白質の発現系を構築し、該発現系を用いたレセプター結合アッセイ系を用いることによって、本発明のレセプター蛋白質に結合して細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca<sup>2+</sup>遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fos活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性）を有する化合物（例えば、ペプチド、蛋白質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物など）の結合量・細胞刺激活性を測定することができる。

15 該測定方法においては、本発明のレセプター蛋白質と本発明のRFRP-3または試験化合物とを接触させた場合の、例えば、該本発明のレセプター蛋白質に対する試験化合物の結合量や、細胞刺激活性などを測定することを特徴とする。

より具体的には、本発明は、

- 20 ①標識した本発明のRFRP-3または試験化合物を、本発明のレセプター蛋白質に接触させた場合における、標識した本発明のRFRP-3または試験化合物の該蛋白質に対する結合量を測定することを特徴とする測定方法、
- ②標識した本発明のRFRP-3または試験化合物を、本発明のレセプター蛋白質を含有する細胞または該細胞の膜面分に接触させた場合における、標識した本発明のRFRP-3または試験化合物の該細胞または該膜面分に対する結合量を測定することを特徴とする測定方法、
- 25 ③標識した本発明のRFRP-3または試験化合物を、本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したレセプター蛋白質に接触させた場合における、標識した本

発明のRFRP-3または試験化合物の該レセプター蛋白質に対する結合量を測定することを特徴とする測定方法、

- ④本発明のRFRP-3または試験化合物を、本発明のレセプター蛋白質を含有する細胞に接触させた場合における、レセプター蛋白質を介した細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 $Ca^{2+}$ 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を測定することを特徴とする測定方法、および
- ⑤本発明のRFRP-3または試験化合物を、本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したレセプター蛋白質に接触させた場合における、レセプター蛋白質を介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 $Ca^{2+}$ 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を測定することを特徴とする測定方法を提供する。

特に、上記①～③の試験を行ない、試験化合物が本発明のレセプター蛋白質に結合することを確認した後に、上記④～⑤の試験を行なうことが好ましい。

まず、本測定方法に用いるレセプター蛋白質としては、上記した本発明のレセプター蛋白質を含有するものであれば何れのものであってもよいが、動物細胞を用いて大量発現させたレセプター蛋白質が適している。

本発明のレセプター蛋白質を製造するには、前述の発現方法が用いられるが、該レセプター蛋白質をコードするDNAを哺乳動物細胞や昆虫細胞で発現することにより行なうことが好ましい。目的とする蛋白質部分をコードするDNA断片には、通常、相補DNAが用いられるが、必ずしもこれに制約されるものではない。例えば、遺伝子断片や合成DNAを用いてもよい。本発明のレセプター蛋白質をコードするDNA断片を宿主動物細胞に導入し、

それらを効率よく発現させるためには、該DNA断片を昆虫を宿主とするバ  
キュロウイルスに属する核多角体病ウイルス (nuclear polyhedrosis virus ;  
NPV) のポリヘドリンプロモーター、SV40由来のプロモーター、レト  
ロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒトヒートシ  
5 ョックプロモーター、サイトメガロウイルスプロモーター、SR $\alpha$ プロモ  
ーターなどの下流に組み込むのが好ましい。発現したレセプターの量と質の検  
査はそれ自体公知の方法で行うことができる。例えば、文献 [Nambi, P. ら、  
ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.) , 267  
巻, 19555~19559頁, 1992年] に記載の方法に従って行うことができる。

10 したがって、該測定方法において、本発明のレセプター蛋白質を含有する  
ものとしては、それ自体公知の方法に従って精製したレセプター蛋白質であ  
ってもよいし、該レセプター蛋白質を含有する細胞またはその細胞膜画分を  
用いてもよい。

該測定方法において、本発明のレセプター蛋白質を含有する細胞を用いる  
15 場合、該細胞をグルタルアルデヒド、ホルマリンなどで固定化してもよい。  
固定化方法はそれ自体公知の方法に従って行なうことができる。

本発明のレセプター蛋白質を含有する細胞としては、本発明のレセプター  
蛋白質を発現した宿主細胞をいうが、該宿主細胞としては、大腸菌、枯草菌、  
酵母、昆虫細胞、動物細胞などが用いられる。

20 細胞膜画分としては、細胞を破碎した後、それ自体公知の方法で得られる  
細胞膜が多く含まれる画分のことをいう。細胞の破碎方法としては、Potter  
-Elvehjem型ホモジナイザーで細胞を押し潰す方法、ワーリングブレンダー  
やポリトロン (Kinematica社製) による破碎、超音波による破碎、フレンチ  
プレスなどで加圧しながら細胞を細いノズルから噴出させることによる破碎  
25 などが挙げられる。細胞膜の分画には、分画遠心分離法や密度勾配遠心分離  
法などの遠心力による分画法が主として用いられる。例えば、細胞破碎液を  
低速 (500rpm~3000rpm) で短時間 (通常、約1分~10分)  
遠心し、上清をさらに高速 (15000rpm~30000rpm) で通常  
30分~2時間遠心し、得られる沈澱を膜画分とする。該膜画分中には、発

現したレセプター蛋白質と細胞由来のリン脂質や膜蛋白質などの膜成分が多く含まれる。

該レセプター蛋白質を含有する細胞やその膜面分中のレセプター蛋白質の量は、1細胞当たり $10^3 \sim 10^8$ 分子であるのが好ましく、 $10^5 \sim 10^7$ 分子であるのが好適である。なお、発現量が多いほど膜面分当たりのリガンド結合活性（比活性）が高くなり、高感度なスクリーニング系の構築が可能になるばかりでなく、同一ロットで大量の試料を測定できるようになる。

上記の①～③の方法を実施するためには、適当なレセプター蛋白質画分と、標識した試験化合物が必要である。

10 レセプター蛋白質画分としては、天然型のレセプター蛋白質画分か、またはそれと同等の活性を有する組換え型レセプター画分などが望ましい。ここで、同等の活性とは、同等のリガンド結合活性、シグナル情報伝達作用などを示す。

15 標識した試験化合物としては、 $[^3\text{H}]$ 、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ 、 $[^{35}\text{S}]$ などで標識したペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などから選ばれた化合物などが用いられる。

20 具体的には、まず本発明のレセプター蛋白質を含有する細胞または細胞の膜面分を、決定方法に適したバッファーに懸濁することによりレセプター標品を調製する。バッファーには、pH 4～10（望ましくはpH 6～8）のリン酸バッファー、トリス塩酸バッファーなどのリガンドとレセプター蛋白質との結合を阻害しないバッファーであればいずれでもよい。また、非特異的結合を低減させる目的で、CHAPS、Tween-80<sup>TM</sup>（花王アトラス社）、ジギトニン、デオキシコレートなどの界面活性剤やウシ血清アルブミンやゼラチンなどの各種蛋白質をバッファーに加えることもできる。

25 さらに、プロテアーゼによるレセプターやリガンドの分解を抑える目的でPMSE、ロイペプチン、E-64（ペプチド研究所製）、ペプスタチンなどのプロテアーゼ阻害剤を添加することもできる。0.01ml～10mlの該レセプター溶液に、一定量（5000cpm～500000cpm）の $[^3$

- H]、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ 、 $[^{35}\text{S}]$ などで標識した試験化合物を共存させる。非特異的結合量 (NSB) を知るために大過剰の未標識の試験化合物を加えた反応チューブも用意する。反応は約  $0^{\circ}\text{C}$  ~  $50^{\circ}\text{C}$ 、望ましくは約  $4^{\circ}\text{C}$  ~  $37^{\circ}\text{C}$  で、約 20 分 ~ 24 時間、望ましくは約 30 分 ~ 3 時間行なう。反応後、ガラス繊維濾紙等で濾過し、適量の同バッファーで洗浄した後、ガラス繊維濾紙に残存する放射活性を液体シンチレーションカウンターあるいは  $\gamma$ -カウンターで計測する。全結合量 (B) から非特異的結合量 (NSB) を引いたカウント (B-NSB) が 0 cpm を越える試験化合物を本発明の RFRP-3 の活性を促進する化合物として選択することができる。
- 10 上記の④~⑤の方法を実施するためには、該レセプター蛋白質を介する細胞刺激活性 (例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  遊離、細胞内 cAMP 生成、細胞内 cGMP 生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fos の活性化、pH の低下などを促進する活性または抑制する活性など) を公知の方法または市販の
- 15 測定用キットを用いて測定することができる。具体的には、まず、レセプター蛋白質を含有する細胞をマルチウェルプレート等に培養する。前もって新鮮な培地あるいは細胞に毒性を示さない適当なバッファーに交換し、本発明の RFRP-3 または試験化合物などを添加して一定時間インキュベートした後、細胞を抽出あるいは上清液を回収して、生成した産物をそれぞれの方
- 20 法に従って定量する。細胞刺激活性の指標とする物質 (例えば、アラキドン酸など) の生成が、細胞が含有する分解酵素によって検定困難な場合は、該分解酵素に対する阻害剤を添加してアッセイを行なってもよい。また、cAMP 産生抑制などの活性については、フォルスコリンなどで細胞の基礎的産生量を増大させておいた細胞に対する産生抑制作用として検出することができる。
- 25 上記測定用キットは、本発明のレセプター蛋白質、本発明のレセプター蛋白質を含有する細胞、または本発明のレセプター蛋白質を含有する細胞の膜画分などを含有するものである。
- 該測定用キットの例としては、次のものが挙げられる。

## 1. 測定用試薬

### ①測定用緩衝液および洗浄用緩衝液

Hanks' Balanced Salt Solution (ギブコ社製) に、0.05%のウシ血清アルブミン (シグマ社製) を加えたもの。

- 5 孔径0.45  $\mu$ mのフィルターで濾過滅菌し、4℃で保存するか、あるいは用時調製しても良い。

### ②G蛋白質共役型レセプター蛋白質標品

- 10 本発明のレセプター蛋白質を発現させたCHO細胞を、12穴プレートに  $5 \times 10^5$  個/穴で継代し、37℃、5%CO<sub>2</sub>、95%airで2日間培養したもの。

### ③標識試験化合物

市販の [<sup>3</sup>H]、[<sup>125</sup>I]、[<sup>14</sup>C]、[<sup>35</sup>S] などで標識した化合物、または適当な方法で標識化したもの

- 15 水溶液の状態のものを4℃あるいは-20℃にて保存し、用時に測定用緩衝液にて1  $\mu$ Mに希釈する。水に難溶性を示す試験化合物については、ジメチルホルムアミド、DMSO、メタノール等に溶解する。

### ④非標識試験化合物

標識化合物と同じものを100~1000倍濃い濃度に調製する。

## 2. 測定法

- 20 ①12穴組織培養用プレートにて培養した本発明のレセプター蛋白質発現CHO細胞を、測定用緩衝液1mlで2回洗浄した後、490  $\mu$ lの測定用緩衝液を各穴に加える。

②標識試験化合物を5  $\mu$ l加え、室温にて1時間反応させる。非特異的結合量を知るためには非標識試験化合物を5  $\mu$ l加えておく。

- 25 ③反応液を除去し、1mlの洗浄用緩衝液で3回洗浄する。細胞に結合した標識試験化合物を0.2N NaOH-1%SDSで溶解し、4mlの液体シンチレーターA (和光純薬製) と混合する。

④液体シンチレーションカウンター (ベックマン社製) を用いて放射活性を測定する。

(4) 本発明のスクリーニング方法で得られる化合物を含有する医薬

本発明のスクリーニング方法または本発明のスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩は、当該化合物がプロラクチン分泌の促進作用を有する場合はプロラクチン分泌不全に関係する各種疾患の予防および  
5 治療薬に用いることができ、プロラクチン分泌の抑制作用を有する場合はプロラクチン過剰分泌に関係する各種疾患の予防・治療薬に用いることができる。

得られる化合物またはその塩がプロラクチン分泌の促進作用を有する場合、  
該化合物またはその塩は、プロラクチン分泌促進剤として、卵巣機能低下症、  
10 精囊發育不全、骨粗鬆症、更年期障害、乳汁分泌不全、甲状腺機能低下、腎不全などのプロラクチン分泌に関係する各種疾患の予防・治療薬として有用である。

さらに、該化合物またはその塩は、プロラクチン分泌促進作用に基づき、  
性欲促進作用（フェロモンの作用）を有するため、性欲促進剤としても有用  
15 である。

一方、得られる化合物またはその塩がプロラクチン分泌の抑制作用を有する場合は、プロラクチン過剰分泌に関係する各種疾患の予防・治療薬に用いることができ、

該化合物またはその塩は、プロラクチン分泌抑制剤として、高プロラクチン血症、下垂体腺腫瘍、間脳腫瘍、月経異常、ストレス、自己免疫疾患、プロラクチノーマ、不妊症、インポテンス、無月経症、乳汁漏症、末端肥大症、キアリ・フロンメル（Chiari-Frommel）症候群、アルゴンツ・デル・カスティロ（Argonz-del Castilo）症候群、フォーベス・アルブライト（Forbes-Albright）症候群、乳癌、リンパ腫またはシーハン症候群または精子形成異常などのプロ  
20 ラクチン分泌に関係する各種疾患の予防・治療薬として有用である。

また、該化合物またはその塩は、プロラクチン分泌抑制作用に基づいて、  
避妊薬としても有用である。

その他、得られる化合物またはその塩は、プロラクチン分泌機能を調べるための検査薬としても、また、ウシ、ヤギ、ブタなどの哺乳動物の乳汁の分



泌促進剤などの動物薬としても有用であり、さらには該哺乳動物体内で有用物質を生産させ、これをその乳汁中への分泌することによる有用物質生産などへの応用も期待される。

- さらにまた、得られる化合物またはその塩は、胎盤機能調節作用を有するため、絨毛癌、胞状奇胎、侵入奇胎、流産、胎児の発育不全、糖代謝異常、脂質代謝異常または分娩誘発の予防・治療薬としても有用である。

- 上記スクリーニング方法またはスクリーニングキットを用いて得られる化合物またはその塩のプロラクチン分泌調節活性については、  
Neuroendocrinology, 62巻 1995年 198-206頁、または、Neuroscience Letters 203巻 1996年 164-170頁などに記載の方法またはそれに準じた方法により行うことができ、後述の実施例に記載した方法で行うことが望ましい。

さらに、本発明のRFRP-3の活性を促進する化合物は痛覚障害の予防・治療薬として有用である。

- 一方、本発明のRFRP-3の活性を阻害する化合物は鎮痛薬として有用である。

- 得られる化合物またはその塩を前述の医薬または動物薬として使用する場合は、常套手段に従って実施すればよい。例えば、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、該化合物またはその塩を生理学的に認められる担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製薬実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な用量が得られるようにするものである。

錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えばゼラチン、コーンスターチ、トラガントガム、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、

乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチエリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、前記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、  
5 胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施にしたがって処方することができる。

注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などが挙げられ、適当な溶解補助剤、例えばアルコール（例  
10 えば、エタノール）、ポリアルコール（例えばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン性界面活性剤（例えばポリソルベート 80（ $T^M$ ）、HCO-50）などと併用してもよい。油性液としてはゴマ油、大豆油などがあげられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。また、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナ  
15 リウム緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などと配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに無菌的に充填される。

20 このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば哺乳動物（例えば、ヒト、マウス、ラット、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サル、マントヒヒ、チンパンジーなど）に対して投与することができる。

得られる化合物またはその塩の投与量は、症状などにより差異はあるが、  
25 経口投与する場合、一般的に成人の甲状腺機能低下症患者（体重 60 kg に対し）においては、一日につき通常約 0.1 ~ 100 mg、好ましくは約 1.0 ~ 50 mg、より好ましくは約 1.0 ~ 20 mg である。非経口的に投与する場合は、その 1 回の投与量は投与対象、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば注射剤の形では成人の甲状腺機能低下症患者（体重 60 kg

に対し)においては、一日につき通常約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を静脈注射により投与すればよい。他の動物の場合も、体重60kgあたりに換算した量を投与することができる。

5 (5) 本発明の抗体を用いるRF R P-3の定量

本発明の抗体は、本発明のRF R P-3を特異的に認識することができるので、被検液中の本発明のRF R P-3の定量、特にサンドイッチ免疫測定法による定量などに使用することができる。

すなわち、本発明は、

- 10 (i) 本発明の抗体と、被検液および標識化された本発明のRF R P-3とを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化された本発明のRF R P-3の割合を測定することを特徴とする被検液中の本発明のRF R P-3の定量法、および

- 15 (ii) 被検液と担体上に不溶化した本発明の抗体および標識化された本発明の別の抗体とを同時あるいは連続的に反応させたのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することを特徴とする被検液中の本発明のRF R P-3の定量法を提供する。

- 20 上記(ii)の定量法においては、一方の抗体が本発明のRF R P-3のN端部を認識する抗体で、他方の抗体が本発明のRF R P-3のC端部に反応する抗体であることが望ましい。

また、本発明のRF R P-3に対するモノクローナル抗体を用いて本発明のRF R P-3の定量を行うことができるほか、組織染色等による検出を行なうこともできる。これらの目的には、抗体分子そのものを用いてもよく、また、抗体分子のF(a b')<sub>2</sub>、F a b'、あるいはF a b画分を用いてもよい。

- 25 本発明の抗体を用いる本発明のRF R P-3の定量法は、特に制限されるべきものではなく、被測定液中の抗原量(例えば、RF R P-3量)に対応した抗体、抗原もしくは抗体-抗原複合体の量を化学的または物理的手段により検出し、これを既知量の抗原を含む標準液を用いて作製した標準曲線より算出する測定法であれば、いずれの測定法を用いてもよい。例えば、ネフ

ロメトリー、競合法、イムノメトリック法およびサンドイッチ法が好適に用いられるが、感度、特異性の点で、後述するサンドイッチ法を用いるのが特に好ましい。

5 標識物質を用いる測定法に用いられる標識剤としては、例えば、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質などが用いられる。放射性同位元素としては、例えば、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{131}\text{I}]$ 、 $[^3\text{H}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ などが用いられる。上記酵素としては、安定で比活性の大きなものが好ましく、例えば、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、 $\beta$ -グルコシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、パーオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素などが用いられる。蛍光物質としては、  
10 例えば、フルオレスカミン、フルオレッセンイソチオシアネートなどが用いられる。発光物質としては、例えば、ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニンなどが用いられる。さらに、抗体あるいは抗原と標識剤との結合にビオチン-アビジン系を用いることもできる。

15 抗原あるいは抗体の不溶化に当っては、物理吸着を用いてもよく、また通常ペプチドあるいは酵素等を不溶化、固定化するのに用いられる化学結合を用いる方法でもよい。担体としては、アガロース、デキストラン、セルロースなどの不溶性多糖類、ポリスチレン、ポリアクリルアミド、シリコン等の合成樹脂、あるいはガラス等があげられる。

20 サンドイッチ法においては不溶化した本発明のモノクローナル抗体に被検液を反応させ（1次反応）、さらに標識化した別の本発明のモノクローナル抗体を反応させ（2次反応）たのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することにより被検液中の本発明のRFRP-3量を定量することができる。  
1次反応と2次反応は逆の順序に行っても、また、同時に行なってもよいし時間をずらして行なってもよい。標識化剤および不溶化の方法は前記のそれ  
25 らに準じることができる。また、サンドイッチ法による免疫測定法において、固相用抗体あるいは標識用抗体に用いられる抗体は必ずしも1種類である必要はなく、測定感度を向上させる等の目的で2種類以上の抗体の混合物を用いてもよい。

本発明のサンドイッチ法による本発明のRFRP-3の測定法においては、

1 次反応と 2 次反応に用いられる本発明のモノクローナル抗体は、本発明の R F R P - 3 の結合する部位が相異なる抗体が好ましく用いられる。すなわち、1 次反応および 2 次反応に用いられる抗体は、例えば、2 次反応で用いられる抗体が、本発明の R F R P - 3 の C 端部を認識する場合、1 次反応で  
5 用いられる抗体は、好ましくは C 端部以外、例えば N 端部を認識する抗体が  
用いられる。

本発明のモノクローナル抗体をサンドイッチ法以外の測定システム、例えば、競合法、イムノメトリック法あるいはネフロメトリーなどに用いることができる。

10 競合法では、被検液中の抗原と標識抗原とを抗体に対して競合的に反応させたのち、未反応の標識抗原 (F) と、抗体と結合した標識抗原 (B) とを分離し (B / F 分離)、B、F いずれかの標識量を測定し、被検液中の抗原量を定量する。本反応法には、抗体として可溶性抗体を用い、B / F 分離をポリエチレングリコール、前記抗体に対する第 2 抗体などを用いる液相法、および、第 1 抗体として固相化抗体を用いるか、あるいは、第 1 抗体は可溶性  
15 のものを用い第 2 抗体として固相化抗体を用いる固相化法とが用いられる。

イムノメトリック法では、被検液中の抗原と固相化抗原とを一定量の標識化抗体に対して競合反応させた後固相と液相を分離するか、あるいは、被検液中の抗原と過剰量の標識化抗体とを反応させ、次に固相化抗原を加え未反応の標識化抗体を固相に結合させたのち、固相と液相を分離する。次に、い  
20 ずれかの相の標識量を測定し被検液中の抗原量を定量する。

また、ネフロメトリーでは、ゲル内あるいは溶液中で抗原抗体反応の結果生じた不溶性の沈降物の量を測定する。被検液中の抗原量が僅かであり、少量の沈降物しか得られない場合にもレーザーの散乱を利用するレーザーネフ  
25 ロメトリーなどが好適に用いられる。

これら個々の免疫学的測定法を本発明の定量方法に適用するにあたっては、特別の条件、操作等の設定は必要とされない。それぞれの方法における通常の条件、操作法に当業者の通常の技術的配慮を加えて本発明の R F R P - 3 の測定系を構築すればよい。これらの一般的な技術手段の詳細については、

総説、成書などを参照することができる。

例えば、入江 寛編「ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和49年発行)、  
入江 寛編「続ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和54年発行)、石川  
栄治ら編「酵素免疫測定法」(医学書院、昭和53年発行)、石川栄治ら編  
5 「酵素免疫測定法」(第2版)(医学書院、昭和57年発行)、石川栄治ら  
編「酵素免疫測定法」(第3版)(医学書院、昭和62年発行)、「Methods  
in ENZYMOLOGY」Vol. 70(Immunochemical Techniques(Part A))、同書 Vol.  
73(Immunochemical Techniques(Part B))、同書 Vol. 74(Immunochemical  
Techniques(Part C))、同書 Vol. 84(Immunochemical Techniques(Part D :  
10 Selected Immunoassays))、同書 Vol. 92(Immunochemical Techniques(Part  
E : Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods))、同書 Vol.  
121(Immunochemical Techniques(Part I : Hybridoma Technology and  
Monoclonal Antibodies)) (以上、アカデミックプレス社発行)などを参照する  
ことができる。

- 15 以上のようにして、本発明の抗体を用いることによって、本発明のRFRP-3を感度良く定量することができる。

- さらには、本発明の抗体を用いて本発明のRFRP-3の濃度を定量することによって、本発明のRFRP-3の濃度異常が検出された場合、例えば、  
20 卵巣機能低下症、精嚢發育不全、骨粗鬆症、更年期障害、乳汁分泌不全、甲状腺機能低下、腎不全、高プロラクチン血症、下垂体腺腫瘍、間脳腫瘍、月経異常、ストレス、自己免疫疾患、プロラクチノーマ、不妊症、インポテン  
ス、無月経症、乳汁漏症、末端肥大症、キアリ・フロンメル (Chiari-Frommel) 症候群、アルゴンツ-デル・カスティロ (Argonz-del Castilo) 症候群、フォー  
25 ーベス・アルブライト (Forbes-Albright) 症候群、乳癌、リンパ腫、シーハン症候群、精子形成異常などのプロラクチン分泌に関係する疾病または痛覚  
障害である、または将来罹患する可能性が高いと診断することができる。

また、本発明の抗体は、体液や組織などの被検体中に存在する本発明のRFRP-3を検出するために使用することができる。また、本発明のRFRP-3を精製するために使用する抗体カラムの作製、精製時の各分画中の本

発明のRFRP-3の検出、被検細胞内における本発明のRFRP-3の挙動の分析などのために使用することができる。

#### (6) 遺伝子診断剤

5 本発明のDNAは、例えば、プローブとして使用することにより、ヒトまたは温血動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、トリ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サル、など）における本発明のRFRP-3をコードするDNAまたはmRNAの異常（遺伝子異常）を検出することができるので、例えば、該DNAまたはmRNAの損傷、突然変異あるいは発現低下や、該DNAまたはmRNAの増加あるいは発現過多などの遺  
10 伝子診断剤として有用である。

本発明のDNAを用いる上記の遺伝子診断は、例えば、自体公知のノーザンハイブリダイゼーションやPCR-SSCP法(ゲノミックス(Genomics)、第5巻、874～879頁(1989年)、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ユーエスエー  
15 (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America)、第86巻、2766～2770頁(1989年))などにより実施することができる。

例えば、ノーザンハイブリダイゼーションにより発現異常が検出された場合は、例えば、卵巣機能低下症、精嚢発育不全、骨粗鬆症、更年期障害、乳汁分泌不全、甲状腺機能低下、腎不全、高プロラクチン血症、下垂体腺腫瘍、  
20 間脳腫瘍、月経異常、ストレス、自己免疫疾患、プロラクチノーマ、不妊症、インポテンス、無月経症、乳汁漏症、末端肥大症、キアリ・フロンメル  
(Chiari-Frommel) 症候群、アルゴンツ-デル・カスティロ (Argonz-del Castilo) 症候群、フォーベス・アルブライト (Forbes-Albright) 症候群、  
25 乳癌、リンパ腫またはシーハン症候群、精子形成異常などのプロラクチン分泌に関係する疾病または痛覚障害である、または将来罹患する可能性が高いと診断することができる。

#### (7) アンチセンスDNAを含有する医薬

本発明のDNAに相補的に結合し、該DNAの発現を抑制することができる

るアンチセンスDNAは、例えば、前記したプロラクチン分泌に関係する各種疾患の予防・治療薬、鎮痛薬として有用である。

例えば、該アンチセンスDNAを用いる場合、該アンチセンスDNAを単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエートドウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、  
5 常套手段に従って実施することができる。該アンチセンスDNAは、そのまま、あるいは摂取促進のために補助剤などの生理学的に認められる担体とともに製剤化し、遺伝子銃やマイクロカテーテルのようなカテーテルによって投与できる。製剤化は、前記した本発明のRFRP-3を含有する医  
10 薬と同様に行うことができる。

本発明のアンチセンスDNAの投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に例えば、不妊症患者（60kgとして）においては、一日につき約0.1mg～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mgである。  
15 非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常例えば、高プロラクチン血症患者（60kgとして）においては、一日につき約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当りに換算した量を投与することができる。  
20

さらに、該アンチセンスDNAは、組織や細胞における本発明のDNAの存在やその発現状況を調べるための診断用オリゴヌクレオチドプローブとして使用することもできる。

#### (8) 本発明の抗体を含有する医薬

25 本発明のRFRP-3の活性を中和する作用を有する本発明の抗体は、例えば、前記したプロラクチン分泌に関係する各種疾患の予防・治療薬、鎮痛薬として有用である。

本発明の抗体を含有する上記疾患の治療・予防剤は、そのまま液剤として、または適当な剤型の医薬組成物として、ヒトまたは哺乳動物（例、ラット、



ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど) に対して経口的または非経口的に投与することができる。投与量は、投与対象、対象疾患、症状、投与ルートなどによっても異なるが、例えば、成人の高プロラクチン血症患者の治療・予防のために使用する場合には、本発明の抗体を1回量として、

- 5 通常0.01~20mg/kg体重程度、好ましくは0.1~10mg/kg体重程度、さらに好ましくは0.1~5mg/kg体重程度を、1日1~5回程度、好ましくは1日1~3回程度、静脈注射により投与するのが好都合である。他の非経口投与および経口投与の場合もこれに準ずる量を投与することができる。症状が特に重い場合には、その症状に応じて増量してもよい。

- 10 本発明の抗体は、それ自体または適当な医薬組成物として投与することができる。上記投与に用いられる医薬組成物は、上記またはその塩と薬理学的に許容され得る担体、希釈剤もしくは賦形剤とを含むものである。かかる組成物は、経口または非経口投与に適する剤形として提供される。

- すなわち、例えば、経口投与のための組成物としては、固体または液体の  
15 剤形、具体的には錠剤(糖衣錠、フィルムコーティング錠を含む)、丸剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤(ソフトカプセル剤を含む)、シロップ剤、乳剤、懸濁剤などがあげられる。かかる組成物は自体公知の方法によって製造され、製剤分野において通常用いられる担体、希釈剤もしくは賦形剤を含有するものである。例えば、錠剤用の担体、賦形剤としては、乳糖、でんぷん、蔗糖、  
20 ステアリン酸マグネシウムなどが用いられる。

- 非経口投与のための組成物としては、例えば、注射剤、坐剤などが用いられ、注射剤は静脈注射剤、皮下注射剤、皮内注射剤、筋肉注射剤、点滴注射剤などの剤形を包含する。かかる注射剤は、自体公知の方法に従って、例えば、上記抗体またはその塩を通常注射剤に用いられる無菌の水性もしくは油性液に溶解、懸濁または乳化することによって調製する。注射用の水性液として、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液などが用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール(例、エタノール)、  
25 ポリアルコール(例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール)、非イオン界面活性剤[例、ポリソルベート80、HCO-50

(polyoxyethylene (50mol) adduct of hydrogenated castor oil) ] などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが用いられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどを併用してもよい。調製された注射液は、通常、適当なアンプルに充填される。直腸  
5 投与に用いられる坐剤は、上記抗体またはその塩を通常の坐薬用基剤に混合することによって調製される。

上記の経口用または非経口用医薬組成物は、活性成分の投与量に適合するような投薬単位の剤形に調製されることが好都合である。かかる投薬単位の剤形としては、錠剤、丸剤、カプセル剤、注射剤（アンプル）、坐剤などが  
10 例示され、それぞれの投薬単位剤形当たり通常5～500mg、とりわけ注射剤では5～100mg、その他の剤形では10～250mgの上記抗体が含有されていることが好ましい。

なお前記した各組成物は、上記抗体との配合により好ましくない相互作用を生じない限り他の活性成分を含有してもよい。

15 (9) DNA転移動物

本発明は、外来性の本発明のRFRP-3をコードするDNA（以下、本発明の外来性DNAと略記する）またはその変異DNA（本発明の外来性変異DNAと略記する場合がある）を有する非ヒト哺乳動物を提供する。

すなわち、本発明は、

- 20 (1) 本発明の外来性DNAまたはその変異DNAを有する非ヒト哺乳動物、  
(2) 非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である第(1)記載の動物、  
(3) ゲッ歯動物がマウスまたはラットである第(2)記載の動物、および  
(4) 本発明の外来性DNAまたはその変異DNAを含有し、哺乳動物において発現しうる組換えベクターを提供するものである。

25 本発明の外来性DNAまたはその変異DNAを有する非ヒト哺乳動物（以下、本発明のDNA転移動物と略記する）は、未受精卵、受精卵、精子およびその始原細胞を含む胚芽細胞などに対して、好ましくは、非ヒト哺乳動物の発生における胚発生の段階（さらに好ましくは、単細胞または受精卵細胞の段階でかつ一般に8細胞期以前）に、リン酸カルシウム法、電気パルス法、

リポフェクション法、凝集法、マイクロインジェクション法、パーティクルガン法、DEAE-デキストラン法などにより目的とするDNAを転移することによって作出することができる。また、該DNA転移方法により、体細胞、生体の臓器、組織細胞などに目的とする本発明の外来性DNAを転移し、  
5 細胞培養、組織培養などに利用することもでき、さらに、これら細胞を上述の胚芽細胞と自体公知の細胞融合法により融合させることにより本発明のDNA転移動物を作出することもできる。

非ヒト哺乳動物としては、例えば、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、マウス、ラットなどが用いられる。  
10 なかでも、病体動物モデル系の作成の面から個体発生および生物サイクルが比較的短く、また、繁殖が容易なゲッ歯動物、とりわけマウス（例えば、純系として、C57BL/6系統、DBA2系統など、交雑系として、B6C3F<sub>1</sub>系統、BDF<sub>1</sub>系統、B6D2F<sub>1</sub>系統、BALB/c系統、ICR系統など）またはラット（例えば、Wistar、SDなど）などが好ましい。

15 哺乳動物において発現しうる組換えベクターにおける「哺乳動物」としては、上記の非ヒト哺乳動物の他にヒトなどがあげられる。

本発明の外来性DNAとは、非ヒト哺乳動物が本来有している本発明のDNAではなく、いったん哺乳動物から単離・抽出された本発明のDNAをいう。

20 本発明の変異DNAとしては、元の本発明のDNAの塩基配列に変異（例えば、突然変異など）が生じたもの、具体的には、塩基の付加、欠損、他の塩基への置換などが生じたDNAなどが用いられ、また、異常DNAも含まれる。

25 該異常DNAとしては、異常な本発明のRFRP-3を発現させるDNAを意味し、例えば、正常な本発明のRFRP-3の機能を抑制するRFRP-3を発現させるDNAなどが用いられる。

本発明の外来性DNAは、対象とする動物と同種あるいは異種のどちらの哺乳動物由来のものであってもよい。本発明のDNAを対象動物に転移させるにあたっては、該DNAを動物細胞で発現させうるプロモーターの下流に

結合したDNAコンストラクトとして用いるのが一般に有利である。例えば、本発明のヒトDNAを転移させる場合、これと相溶性が高い本発明のDNAを有する各種哺乳動物（例えば、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）由来のDNAを発現させる各種プロモーターの下流に、本発明のヒトDNAを結合したDNAコンストラクト（例、ベクターなど）を対象哺乳動物の受精卵、例えば、マウス受精卵へマイクロインジェクションすることによって本発明のDNAを高発現するDNA転移哺乳動物を作出することができる。

本発明のRFRP-3の発現ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド、枯草菌由来のプラスミド、酵母由来のプラスミド、 $\lambda$ ファージなどのバクテリオファージ、モロニー白血病ウィルスなどのレトロウィルス、ワクシニアウィルスまたはバキュロウィルスなどの動物ウィルスなどが用いられる。なかでも、大腸菌由来のプラスミド、枯草菌由来のプラスミドまたは酵母由来のプラスミドなどが好ましく用いられる。

上記のDNA発現調節を行なうプロモーターとしては、例えば、①ウィルス（例、シミアンウィルス、サイトメガロウィルス、モロニー白血病ウィルス、JCウィルス、乳癌ウィルス、ポリオウィルスなど）に由来するDNAのプロモーター、②各種哺乳動物（ヒト、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）由来のプロモーター、例えば、アルブミン、インスリンII、ウロプラキンII、エラスターゼ、エリスロポエチン、エンドセリン、筋クレアチンキナーゼ、グリア線維性酸性タンパク質、グルタチオンS-トランスフェラーゼ、血小板由来成長因子 $\beta$ 、ケラチンK1、K10およびK14、コラーゲンI型およびII型、サイクリックAMP依存タンパク質キナーゼ $\beta$ Iサブユニット、ジストロフィン、酒石酸抵抗性アルカリフォスファターゼ、心房ナトリウム利尿性因子、内皮レセプターチロシンキナーゼ（一般にTie2と略される）、ナトリウムカリウムアデノシン3リン酸化酵素（Na, K-ATPase）、ニューロフィラメント軽鎖、メタロチオネインIおよびIIA、メタロプロティナーゼ1組織インヒビター、MHCクラスI抗原（H-2L）、H-ras、レニン、ドーパミン $\beta$

ー水酸化酵素、甲状腺ペルオキシダーゼ (TPO)、ペプチド鎖延長因子1 $\alpha$  (EF-1 $\alpha$ )、 $\beta$ アクチン、 $\alpha$ および $\beta$ ミオシン重鎖、ミオシン軽鎖1および2、ミエリン基礎タンパク質、チログロブリン、Thy-1、免疫グロブリン、H鎖可変部 (VNP)、血清アミロイドPコンポーネント、ミオグロビン、トロポニンC、平滑筋 $\alpha$ アクチン、プレプロエンケファリンA、パソプレシンなどのプロモーターなどが用いられる。なかでも、全身で高発現することが可能なサイトメガロウイルスプロモーター、ヒトペプチド鎖延長因子1 $\alpha$  (EF-1 $\alpha$ ) のプロモーター、ヒトおよびニワトリ $\beta$ アクチンプロモーターなどが好適である。

10 上記ベクターは、DNA転移哺乳動物において目的とするメッセンジャーRNAの転写を終結する配列 (一般にターミネターと呼ばれる) を有していることが好ましく、例えば、ウイルス由来および各種哺乳動物由来の各DNAの配列を用いることができ、好ましくは、シミアンウイルスのSV40ターミネターなどが用いられる。

15 その他、目的とする外来性DNAをさらに高発現させる目的で各DNAのスプライシングシグナル、エンハンサー領域、真核DNAのイントロンの一部などをプロモーター領域の5'上流、プロモーター領域と翻訳領域間あるいは翻訳領域の3'下流に連結することも目的により可能である。

20 正常な本発明のRFRP-3の翻訳領域は、ヒトまたは各種哺乳動物 (例えば、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど) 由来の肝臓、腎臓、甲状腺細胞、線維芽細胞由来DNAおよび市販の各種ゲノムDNAライブラリーよりゲノムDNAの全てあるいは一部として、または肝臓、腎臓、甲状腺細胞、線維芽細胞由来RNAより公知の方法により調製された相補DNAを原料として取得することが出来る。また、外来性の異常DNAは、上記の細胞または組織より得られた正常なRFRP-3の翻訳領域を点突然変異誘発法により変異した翻訳領域を作製することができる。

25 該翻訳領域は転移動物において発現しうるDNAコンストラクトとして、前記のプロモーターの下流および所望により転写終結部位の上流に連結させる通常のDNA工学的手法により作製することができる。

受精卵細胞段階における本発明の外來性DNAの転移は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞のすべてに存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において、本発明の外來性DNAが存在することは、作出動物の後代がすべて、その胚芽細胞および体細胞のすべてに本発明の外來性DNAを保持することを意味する。本発明の外來性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞のすべてに本発明の外來性DNAを有する。

本発明の外來性正常DNAを転移させた非ヒト哺乳動物は、交配により外來性DNAを安定に保持することを確認して、該DNA保有動物として通常の飼育環境で継代飼育することが出来る。

受精卵細胞段階における本発明の外來性DNAの転移は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞の全てに過剰に存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において本発明の外來性DNAが過剰に存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の外來性DNAを過剰に有することを意味する。本発明の外來性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の外來性DNAを過剰に有する。

導入DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該DNAを過剰に有するように繁殖継代することができる。

本発明の正常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、本発明の正常DNAが高発現させられており、内在性の正常DNAの機能を促進することにより最終的に本発明のRFRP-3の機能亢進症を発症することがあり、その病態モデル動物として利用することができる。例えば、本発明の正常DNA転移動物を用いて、本発明のRFRP-3の機能亢進症や、本発明のRFRP-3が関連する疾患の病態機序の解明およびこれらの疾患の治療方法の検討を行うことが可能である。

また、本発明の外來性正常DNAを転移させた哺乳動物は、遊離した本発明のRFRP-3の増加症状を有することから、本発明のRFRP-3に関

連する疾患に対する治療薬のスクリーニング試験にも利用可能である。

一方、本発明の外來性異常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、交配により外來性DNAを安定に保持することを確認して該DNA保有動物として通常の飼育環境で継代飼育することが出来る。さらに、目的とする外來DNAを  
5 前述のプラスミドに組み込んで原料として用いることができる。プロモーターとのDNAコンストラクトは、通常のDNA工学的手法によって作製することができる。受精卵細胞段階における本発明の異常DNAの転移は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞の全てに存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において本発明の異常DNAが存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の異常  
10 DNAを有することを意味する。本発明の外來性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫は、その胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の異常DNAを有する。導入DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該DNAを有するように繁殖継代することができる。  
15

本発明の異常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、本発明の異常DNAが高発現させられており、内在性の正常DNAの機能を阻害することにより最終的に本発明のRFRP-3の機能不活性型不応症となることがあり、その病態モデル動物として利用することができる。例えば、本発明の異常DNA転  
20 移動動物を用いて、本発明のRFRP-3の機能不活性型不応症の病態機序の解明およびこの疾患を治療方法の検討を行なうことが可能である。

また、具体的な利用可能性としては、本発明の異常DNA高発現動物は、本発明のRFRP-3の機能不活性型不応症における本発明の異常RFRP-3による正常RFRP-3の機能阻害（dominant negative作用）を解明す  
25 るモデルとなる。

また、本発明の外來異常DNAを転移させた哺乳動物は、遊離した本発明のRFRP-3の増加症状を有することから、本発明のRFRP-3または機能不活性型不応症に対する治療薬スクリーニング試験にも利用可能である。

また、上記2種類の本発明のDNA転移動物のその他の利用可能性として、

例えば、

- ①組織培養のための細胞源としての使用、
- ②本発明のDNA転移動物の組織中のDNAもしくはRNAを直接分析するか、またはDNAにより発現されたペプチド組織を分析することによる、本
- 5 発明のRFRP-3により特異的に発現あるいは活性化するペプチドとの関連性についての解析、
- ③DNAを有する組織の細胞を標準組織培養技術により培養し、これらを使用して、一般に培養困難な組織からの細胞の機能の研究、
- ④上記③記載の細胞を用いることによる細胞の機能を高めるような薬剤のスクリーニング、および
- 10 ⑤本発明の変異RFRP-3を単離精製およびその抗体作製などが考えられる。

さらに、本発明のDNA転移動物を用いて、本発明のRFRP-3の機能不活性型不応症などを含む、本発明のRFRP-3に関連する疾患の臨床症

15 状を調べることができ、また、本発明のRFRP-3に関連する疾患モデルの各臓器におけるより詳細な病理学的所見が得られ、新しい治療方法の開発、さらには、該疾患による二次的疾患の研究および治療に貢献することができる。

また、本発明のDNA転移動物から各臓器を取り出し、細切後、トリプシンなどのタンパク質分解酵素により、遊離したDNA転移細胞の取得、その

20 培養またはその培養細胞の系統化を行なうことが可能である。さらに、本発明のRFRP-3産生細胞の特定化、アポトーシス、分化あるいは増殖との関連性、またはそれらにおけるシグナル伝達機構を調べ、それらの異常を調べることなどができ、本発明のRFRP-3およびその作用解明のための有効な研究材料となる。

25

さらに、本発明のDNA転移動物を用いて、本発明のRFRP-3の機能不活性型不応症を含む、本発明のRFRP-3に関連する疾患の治療薬の開発を行なうために、上述の検査法および定量法などを用いて、有効で迅速な該疾患治療薬のスクリーニング法を提供することが可能となる。また、本発



明のDNA転移動物または本発明の外来性DNA発現ベクターを用いて、本発明のRFRP-3が関連する疾患のDNA治療法を検討、開発することが可能である。

(10) ノックアウト動物

- 5 本発明は、本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞および本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を提供する。

すなわち、本発明は、

- (1) 本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞、  
(2) 該DNAがレポーター遺伝子（例、大腸菌由来の $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子）を導入することにより不活性化された第(1)項記載の胚幹細胞、  
10 (3) ネオマイシン耐性である第(1)項記載の胚幹細胞、  
(4) 非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である第(1)項記載の胚幹細胞、  
(5) ゲッ歯動物がマウスである第(4)項記載の胚幹細胞、  
(6) 本発明のDNAが不活性化された該DNA発現不全非ヒト哺乳動物、  
15 (7) 該DNAがレポーター遺伝子（例、大腸菌由来の $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子）を導入することにより不活性化され、該レポーター遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターの制御下で発現しうる第(6)項記載の非ヒト哺乳動物、  
(8) 非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である第(6)項記載の非ヒト哺乳動物、  
20 (9) ゲッ歯動物がマウスである第(8)項記載の非ヒト哺乳動物、および  
(10) 第(7)項記載の動物に、試験化合物を投与し、レポーター遺伝子の発現を検出することを特徴とする本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。
- 25 本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞とは、該非ヒト哺乳動物が有する本発明のDNAに人為的に変異を加えることにより、DNAの発現能を抑制するか、もしくは該DNAがコードしている本発明のRFRP-3の活性を実質的に喪失させることにより、DNAが実質的に本発明のRFRP-3の発現能を有さない（以下、本発明のノックアウトDNAと

称することがある) 非ヒト哺乳動物の胚幹細胞 (以下、E S細胞と略記する) をいう。

非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものが用いられる。

5 本発明のDNAに人為的に変異を加える方法としては、例えば、遺伝子工学的手法により該DNA配列の一部又は全部の削除、他DNAを挿入または置換させることによって行なうことができる。これらの変異により、例えば、コドンの読み取り枠をずらしたり、プロモーターあるいはエキソンの機能を破壊することにより本発明のノックアウトDNAを作製すればよい。

10 本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞 (以下、本発明のDNA不活性化E S細胞または本発明のノックアウトE S細胞と略記する) の具体例としては、例えば、目的とする非ヒト哺乳動物が有する本発明のDNAを単離し、そのエキソン部分にネオマイシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子を代表とする薬剤耐性遺伝子、あるいはlacZ ( $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子)、cat (クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子) を代表とするレポーター遺伝子等を挿入することによりエキソンの機能を破壊するか、あるいはエキソン間のイントロン部分に遺伝子の転写を終結させるDNA配列 (例えば、polyA付加シグナルなど) を挿入し、完全なメッセンジャーRNAを合成できなくすることによって、結果的に遺伝子を破壊するように構築したDNA配列を有するDNA鎖 (以下、  
15 ターゲッティングベクターと略記する) を、例えば相同組換え法により該動物の染色体に導入し、得られたE S細胞について本発明のDNA上あるいはその近傍のDNA配列をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析あるいはターゲッティングベクター上のDNA配列とターゲッティングベクター作製に使用した本発明のDNA以外の近傍領域のDNA配列をプライマーとしたPCR法により解析し、本発明のノックアウトE S細胞を選別することにより得ることができる。  
20  
25

また、相同組換え法等により本発明のDNAを不活化させる元のE S細胞としては、例えば、前述のような既に樹立されたものを用いてもよく、また公知 EvansとKaufmaの方法に準じて新しく樹立したものでもよい。例えば、

マウスのES細胞の場合、現在、一般的には129系のES細胞が使用されているが、免疫学的背景がはっきりしていないので、これに代わる純系で免疫学的に遺伝的背景が明らかなES細胞を取得するなどの目的で例えば、C57BL/6マウスやC57BL/6の採卵数の少なさをDBA/2との交雑により改善したBDF<sub>1</sub>マウス(C57BL/6とDBA/2とのF<sub>1</sub>)を用いて樹立したものなども良好に用いる。BDF<sub>1</sub>マウスは、採卵数が多く、かつ、卵が丈夫であるという利点に加えて、C57BL/6マウスを背景に持つので、これを用いて得られたES細胞は病態モデルマウスを作出したとき、C57BL/6マウスとバッククロスすることでその遺伝的背景をC57BL/6マウスに代えることが可能である点で有利に用い得る。

また、ES細胞を樹立する場合、一般には受精後3.5日目の胚盤胞を使用するが、これ以外に8細胞期胚を採卵し胚盤胞まで培養して用いることにより効率よく多数の初期胚を取得することができる。

また、雌雄いずれのES細胞を用いてもよいが、通常雄のES細胞の方が生殖系列キメラを作出するのに都合が良い。また、煩雑な培養の手間を削減するためにもできるだけ早く雌雄の判別を行なうことが望ましい。

ES細胞の雌雄の判定方法としては、例えば、PCR法によりY染色体上の性決定領域の遺伝子を増幅、検出する方法が、その1例としてあげることができる。この方法を使用すれば、従来、核型分析をするのに約10<sup>6</sup>個の細胞数を要していたのに対して、1コロニー程度のES細胞数(約50個)で済むので、培養初期におけるES細胞の第一次セクションを雌雄の判別で行なうことが可能であり、早期に雄細胞の選定を可能にしたことにより培養初期の手間は大幅に削減できる。

また、第二次セクションとしては、例えば、G-バンディング法による染色体数の確認等により行うことができる。得られるES細胞の染色体数は正常数の100%が望ましいが、樹立の際の物理的操作等の関係上困難な場合は、ES細胞の遺伝子をノックアウトした後、正常細胞(例えば、マウスでは染色体数が2n=40である細胞)に再びクローニングすることが望ましい。

このようにして得られた胚幹細胞株は、通常その増殖性は大変良いが、個体発生できる能力を失いやすいので、注意深く継代培養することが必要である。例えば、STO繊維芽細胞のような適当なフィーダー細胞上でLIF（1～10000U/ml）存在下に炭酸ガス培養器内（好ましくは、5%炭酸ガス、95%空気または5%酸素、5%炭酸ガス、90%空気）で約37℃で培養するなどの方法で培養し、継代時には、例えば、トリプシン/EDTA溶液（通常0.001～0.5%トリプシン/0.1～5mM EDTA、好ましくは約0.1%トリプシン/1mM EDTA）処理により単細胞化し、新たに用意したフィーダー細胞上に播種する方法などがとられる。このような継代は、通常1～3日毎に行なうが、この際に細胞の観察を行い、形態的に異常な細胞が見受けられた場合はその培養細胞は放棄することが望まれる。

ES細胞は、適当な条件により、高密度に至るまで単層培養するか、または細胞集塊を形成するまで浮遊培養することにより、頭頂筋、内臓筋、心筋などの種々のタイプの細胞に分化させることが可能であり〔M. J. Evans及びM. H. Kaufman, ネイチャー (Nature) 第292巻、154頁、1981年; G. R. Martin プロシーディングス・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.) 第78巻、7634頁、1981年; T. C. Doetschman ら、ジャーナル・オブ・エンブリオロジー・アンド・エクスペリメンタル・モルフォロジー、第87巻、27頁、1985年〕、本発明のES細胞を分化させて得られる本発明のDNA発現不全細胞は、インビトロにおける本発明のRFRP-3または本発明のレセプター蛋白質の細胞生物学的検討において有用である。

本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、該動物のmRNA量を公知方法を用いて測定して間接的にその発現量を比較することにより、正常動物と区別することが可能である。

該非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものが用いられる。

本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、例えば、前述のようにして作製したターゲッティングベクターをマウス胚幹細胞またはマウス卵細胞に導入し、導入によりターゲッティングベクターの本発明のDNAが不活性化さ

れたDNA配列が遺伝子相同組換えにより、マウス胚幹細胞またはマウス卵細胞の染色体上の本発明のDNAと入れ換わる相同組換えをさせることにより、本発明のDNAをロックアウトさせることができる。

- 5 本発明のDNAがロックアウトされた細胞は、本発明のDNA上またはその近傍のDNA配列をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析またはターゲッティングベクター上のDNA配列と、ターゲッティングベクターに使用したマウス由来の本発明のDNA以外の近傍領域のDNA配列とをプライマーとしたPCR法による解析で判定することができる。非ヒト哺乳動物胚幹細胞を用いた場合は、遺伝子相同組換えにより、本発明のDNAが
- 10 不活性化された細胞株をクローニングし、その細胞を適当な時期、例えば、8細胞期の非ヒト哺乳動物胚または胚盤胞に注入し、作製したキメラ胚を偽妊娠させた該非ヒト哺乳動物の子宮に移植する。作出された動物は正常な本発明のDNA座をもつ細胞と人為的に変異した本発明のDNA座をもつ細胞との両者から構成されるキメラ動物である。
- 15 該キメラ動物の生殖細胞の一部が変異した本発明のDNA座をもつ場合、このようなキメラ個体と正常個体を交配することにより得られた個体群より、全ての組織が人為的に変異を加えた本発明のDNA座をもつ細胞で構成された個体を、例えば、コートカラーの判定等により選別することにより得られる。このようにして得られた個体は、通常、本発明のRFRP-3のヘテロ
- 20 発現不全個体であり、本発明のRFRP-3または本発明のレセプター蛋白質のヘテロ発現不全個体同志を交配し、それらの産仔から本発明のRFRP-3または本発明のレセプター蛋白質のホモ発現不全個体を得ることができる。

- 卵細胞を使用する場合は、例えば、卵細胞核内にマイクロインジェクション法でDNA溶液を注入することによりターゲッティングベクターを染色体内に導入したトランスジェニック非ヒト哺乳動物を得ることができ、これらのトランスジェニック非ヒト哺乳動物に比べて、遺伝子相同組換えにより本発明のDNA座に変異のあるものを選択することにより得られる。
- 25

このようにして本発明のDNAがロックアウトされている個体は、交配に

より得られた動物個体も該DNAがロックアウトされていることを確認して通常の飼育環境で飼育継代を行なうことができる。

さらに、生殖系列の取得および保持についても常法に従えばよい。すなわち、該不活化DNAの保有する雌雄の動物を交配することにより、該不活化DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得しうる。得られたホモザイゴート動物は、母親動物に対して、正常個体1，ホモザイゴート複数になるような状態で飼育することにより効率的に得ることができる。ヘテロザイゴート動物の雌雄を交配することにより、該不活化DNAを有するホモザイゴートおよびヘテロザイゴート動物を繁殖継代する。

10 本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を作出する上で、非常に有用である。

また、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のRFRP-3または本発明のレセプター蛋白質により誘導され得る種々の生物活性を欠失するため、本発明のRFRP-3または本発明のレセプター蛋白質の生物活性の不活性化を原因とする疾病のモデルとなり得るので、これらの疾病の原因究明及び治療法の検討に有用である。

(10a) 本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病に対して治療・予防効果を有する化合物のスクリーニング方法

20 本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病に対して治療・予防効果を有する化合物のスクリーニングに用いることができる。

すなわち、本発明は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物に試験化合物を投与し、該動物の変化を観察・測定することを特徴とする、本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病に対して治療・予防効果を有する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

25 該スクリーニング方法において用いられる本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものがあげられる。

試験化合物としては、例えば、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿

などがあげられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

具体的には、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を、試験化合物で処理し、無処理の対照動物と比較し、該動物の各器官、組織、疾病の症状などの変化を指標として試験化合物の治療・予防効果を試験することができる。

試験動物を試験化合物で処理する方法としては、例えば、経口投与、静脈注射などが用いられ、試験動物の症状、試験化合物の性質などにあわせて適宜選択す

ることができる。また、試験化合物の投与量は、投与方法、試験化合物の性質などにあわせて適宜選択することができる。

例えば、プロラクチン分泌不全に関係する各種疾患（例、卵巣機能低下症、精囊發育不全、骨粗鬆症、更年期障害、乳汁分泌不全、甲状腺機能低下、腎不全など）やプロラクチン過剰分泌に関係する各種疾患（例、高プロラクチン血症、下垂体腺腫瘍、間脳腫瘍、月経異常、ストレス、自己免疫疾患、プロラクチノーマ、不妊症、インポテンス、無月経症、乳汁漏症、末端肥大症、キアリ・フロンメル（Chiari-Frommel）症候群、アルゴンツ-デル・カスティロ（Argonz-del Castilo）症候群、フォーベス・アルブライト（Forbes-Albright）症候群、乳癌、リンパ腫またはシーハン症候群または精子形成異常など）、痛覚障害などに対して治療・予防効果を有する化合物をスクリーニングする場合、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物に試験化合物を投与し、該動物の血液中のプロラクチン分泌量などを経時的に測定する。

該スクリーニング方法において、試験動物に試験化合物を投与した場合、該試験動物のプロラクチン分泌量が約10%以上、好ましくは約30%以上、より好ましくは約50%以上変化した場合、該試験化合物を上記の疾患に対して治療・予防効果を有する化合物として選択することができる。

該スクリーニング方法を用いて得られる化合物は、上記した試験化合物から選ばれた化合物であり、本発明のRFRP-3の欠損や損傷などによって引き起こされる疾患に対して治療・予防効果を有するので、該疾患に対する安全で低毒性な治療・予防剤などの医薬として使用することができる。さら

に、上記スクリーニングで得られた化合物から誘導される化合物も同様に用いることができる。

該スクリーニング方法で得られた化合物は塩を形成していてもよく、該化合物の塩としては、生理学的に許容される酸（例、無機酸、有機酸など）や塩基（例、アルカリ金属など）などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸など）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸など）との塩などが用いられる。

該スクリーニング方法で得られた化合物またはその塩を含有する医薬は、前記した本発明のRFRP-3を含有する医薬と同様にして製造することができる。

このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは哺乳動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、該化合物を経口投与する場合、一般的に成人（体重60kgとして）の甲状腺機能低下症患者においては、一日につき該化合物を約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、該化合物を注射剤の形で通常成人（60kgとして）の甲状腺機能低下症患者に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kgあたりに換算した量を投与することができる。

(10b) 本発明のDNAに対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物をスクリーニング方法



本発明は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物に、試験化合物を投与し、レポーター遺伝子の発現を検出することを特徴とする本発明のDNAに対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

- 5      上記スクリーニング方法において、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物としては、前記した本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物の中でも、本発明のDNAがレポーター遺伝子を導入することにより不活性化され、該レポーター遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターの制御下で発現するものが用いられる。

- 10     試験化合物としては、前記と同様のものがあげられる。

レポーター遺伝子としては、前記と同様のものが用いられ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子 (lacZ)、可溶性アルカリフォスファターゼ遺伝子またはルシフェラーゼ遺伝子などが好適である。

- 15     本発明のDNAをレポーター遺伝子で置換された本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物では、レポーター遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターの支配下に存在するので、レポーター遺伝子がコードする物質の発現をトレースすることにより、プロモーターの活性を検出することができる。

- 例えば、本発明のRFRP-3をコードするDNA領域の一部を大腸菌由来の $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子 (lacZ) で置換している場合、本来、  
20     本発明のRFRP-3の発現する組織で、本発明のRFRP-3の代わりに $\beta$ -ガラクトシダーゼが発現する。従って、例えば、5-プロモ-4-クロロ-3-インドリル- $\beta$ -ガラクトピラノシド (X-gal) のような $\beta$ -ガラクトシダーゼの基質となる試薬を用いて染色することにより、簡便に本発明のRFRP-3の動物生体内における発現状態を観察することができる。  
25     具体的には、本発明のRFRP-3欠損マウスまたはその組織切片をグルタルアルデヒドなどで固定し、リン酸緩衝生理食塩液 (PBS) で洗浄後、X-galを含む染色液で、室温または37℃付近で、約30分ないし1時間反応させた後、組織標本を1mM EDTA/PBS溶液で洗浄することによって、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ反応を停止させ、呈色を観察すればよい。また、

常法に従い、1 a c ZをコードするmRNAを検出してもよい。

上記スクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩は、上記した試験化合物から選ばれた化合物であり、本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進または阻害する化合物である。

- 5     該スクリーニング方法で得られた化合物は塩を形成していてもよく、該化合物の塩としては、生理学的に許容される酸（例、無機酸など）や塩基（例、有機酸など）などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸など）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、  
10    プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸など）との塩などが用いられる。

- 本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進する化合物またはその塩は、本発明のRFRP-3の発現を促進し、該RFRP-3の機能を促進する  
15    ことができるので、例えば、プロラクチン分泌不全に関する各種疾患の予防および治療薬に用いることができ、プロラクチン分泌促進剤として、卵巣機能低下症、精嚢發育不全、骨粗鬆症、更年期障害、乳汁分泌不全、甲状腺機能低下、腎不全などのプロラクチン分泌に関する各種疾患または痛覚障害の予防・治療薬として有用である。

- 20    さらに、該化合物またはその塩は、プロラクチン分泌促進作用に基づき、性欲促進作用（フェロモンの作用）を有するため、性欲促進剤としても有用である。

- また、本発明のDNAに対するプロモーター活性を阻害する化合物またはその塩は、本発明のRFRP-3の発現を阻害し、該RFRP-3の機能を  
25    阻害することができるので、例えば、プロラクチン過剰分泌に関する各種疾患の予防・治療薬に用いることができ、プロラクチン分泌抑制剤として、高プロラクチン血症、下垂体腺腫瘍、間脳腫瘍、月経異常、ストレス、自己免疫疾患、プロラクチノーマ、不妊症、インポテンス、無月経症、乳汁漏症、末端肥大症、キアリ・フロンメル（Chiari-Frommel）症候群、アルゴンツデー

ル・カスティロ (Argonz-del Castillo) 症候群、フォーベス・アルブライト (Forbes-Albright) 症候群、乳癌、リンパ腫またはシーハン症候群または精子形成異常などのプロラクチン分泌に関係する各種疾患の予防・治療薬として有用である。

- 5      また、該化合物またはその塩は、プロラクチン分泌抑制作用に基づいて、避妊薬としても有用である。

さらに、該化合物またはその塩は、鎮痛薬としても有用である。

- その他、上記スクリーニング方法で得られる化合物またはその塩は、プロラクチン分泌機能を調べるための検査薬としても、また、ウシ、ヤギ、ブタ  
10      などの哺乳動物の乳汁の分泌促進剤などの動物薬としても有用であり、さらには該哺乳動物体内で有用物質を生産させ、これをその乳汁中への分泌することによる有用物質生産などへの応用も期待される。

- さらにまた、上記スクリーニング方法で得られる化合物またはその塩は、胎盤機能調節作用を有するため、絨毛癌、胞状奇胎、侵入奇胎、流産、胎児  
15      の発育不全、糖代謝異常、脂質代謝異常または分娩誘発の予防・治療薬としても有用である。

さらに、上記スクリーニングで得られた化合物から誘導される化合物も同様に用いることができる。

- 該スクリーニング方法で得られた化合物またはその塩を含有する医薬は、  
20      前記した本発明の R F R P - 3 またはその塩を含有する医薬と同様にして製造することができる。

このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは哺乳動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

- 25      該化合物またはその塩の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、本発明の DNA に対するプロモーター活性を促進する化合物を経口投与する場合、一般的に成人（体重 60 kg として）の甲状腺機能低下症患者においては、一日につき該化合物を約 0.1 ~ 100 mg、好ましくは約 1.0 ~ 50 mg、より好ましくは約 1.0 ~ 20 mg

投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進する化合物を注射剤の形で通常成人（60kgとして）の甲状腺機能低下症患者に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kgあたりに換算した量を投与することができる。

一方、例えば、本発明のDNAに対するプロモーター活性を阻害する化合物を経口投与する場合、一般的に成人（体重60kgとして）の高プロラクチン血症患者においては、一日につき該化合物を約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、本発明のDNAに対するプロモーター活性を阻害する化合物を注射剤の形で通常成人（60kgとして）の高プロラクチン血症患者に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kgあたりに換算した量を投与することができる。

このように、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のDNAに対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物またはその塩をスクリーニングする上で極めて有用であり、本発明のDNA発現不全に起因する各種疾患の原因究明または予防・治療薬の開発に大きく貢献することができる。

また、本発明のRFRP-3のプロモーター領域を含有するDNAを使って、その下流に種々のタンパクをコードする遺伝子を連結し、これを動物の卵細胞に注入していわゆるトランスジェニック動物（遺伝子移入動物）を作成すれば、特異的にそのRFRP-3を合成させ、その生体での作用を検討することも可能となる。さらに上記プロモーター部分に適当なレポーター遺伝子を結合させ、これが発現するような細胞株を樹立すれば、本発明のRFR

P-3 そのものの体内での産生能力を特異的に促進もしくは抑制する作用を持つ低分子化合物の探索系として使用できる。

本明細書および図面において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclatureによる略号  
5 あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。またアミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければL体を示すものとする。

	DNA	: デオキシリボ核酸
	cDNA	: 相補的デオキシリボ核酸
10	A	: アデニン
	T	: チミン
	G	: グアニン
	C	: シトシン
	I	: イノシン
15	R	: アデニン (A) またはグアニン (G)
	Y	: チミン (T) またはシトシン (C)
	M	: アデニン (A) またはシトシン (C)
	K	: グアニン (G) またはチミン (T)
	S	: グアニン (G) またはシトシン (C)
20	W	: アデニン (A) またはチミン (T)
	B	: グアニン (G)、グアニン (G) またはチミン (T)
	D	: アデニン (A)、グアニン (G) またはチミン (T)
	V	: アデニン (A)、グアニン (G) またはシトシン (C)
	N	: アデニン (A)、グアニン (G)、シトシン (C)
25		もしくはチミン (T) または不明もしくは他の塩基
	RNA	: リボ核酸
	mRNA	: メッセンジャーリボ核酸
	dATP	: デオキシアデノシン三リン酸
	dTTP	: デオキシチミジン三リン酸

	d G T P	: デオキシグアノシン三リン酸
	d C T P	: デオキシシチジン三リン酸
	A T P	: アデノシン三リン酸
	E D T A	: エチレンジアミン四酢酸
5	S D S	: ドデシル硫酸ナトリウム
	B H A	: ベンズヒドリルアミン
	p M B H A	: p-メチルベンズヒドリルアミン
	T o s	: p-トルエンスルフォニル
	B z l	: ベンジル
10	B o m	: ベンジルオキシメチル
	B o c	: t-ブチルオキシカルボニル
	D C M	: ジクロロメタン
	H O B t	: 1-ヒドロキシベンズトリアゾール
	D C C	: N, N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド
15	T F A	: トリフルオロ酢酸
	D I E A	: ジイソプロピルエチルアミン
	G l y	: グリシン
	A l a または A	: アラニン
	V a l または V	: バリン
20	L e u または L	: ロイシン
	I l e または I	: イソロイシン
	S e r または S	: セリン
	T h r または T	: スレオニン
	C y s または C	: システイン
25	M e t または M	: メチオニン
	G l u または E	: グルタミン酸
	A s p または D	: アスパラギン酸
	L y s または K	: リジン
	A r g または R	: アルギニン

- H i s または H : ヒスチジン  
P h e または F : フェニルアラニン  
T y r または Y : チロシン  
T r p または W : トリプトファン  
5 P r o または P : プロリン  
A s n または N : アスパラギン  
G l n または Q : グルタミン  
p G l u : ピログルタミン酸  
B H A : ベンズヒドリルアミン  
10 p M B H A : p-メチルベンズヒドリルアミン  
T o s : p-トルエンスルフォニル  
B z l : ベンジル  
O c H e x : シクロヘキシルエステル  
B o c : t-ブチルオキシカルボニル  
15 D C M : ジクロロメタン  
H O B t : 1-ヒドロキシベンズトリアゾール  
D C C : N、N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド  
T F A : トリフルオロ酢酸  
D I E A : ジイソプロピルエチルアミン  
20 本願明細書の配列表の配列番号は、以下の配列を示す。  
[配列番号：1]  
後述の参考例1で得られた本発明のポリペプチドのアミノ酸配列（ヒト型）を示す。  
[配列番号：2]  
25 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を含有する本発明のポリペプチドをコードするDNAの塩基配列を示す。  
[配列番号：3]  
後述の参考例1で用いられるプライマーF5の塩基配列を示す。  
[配列番号：4]

後述の参考例 1 で用いられるプライマー F 6 の塩基配列を示す。

〔配列番号：5〕

後述の参考例 1 で用いられるプライマー F 1 の塩基配列を示す。

〔配列番号：6〕

5 後述の参考例 1 で用いられるプライマー R 5 の塩基配列を示す。

〔配列番号：7〕

後述の参考例 3 で用いられるプライマー h R 1 の塩基配列を示す。

〔配列番号：8〕

10 後述の参考例 3 で得られた本発明のポリペプチドのアミノ酸配列（ヒト型）を示す。

〔配列番号：9〕

配列番号：8 で表わされるアミノ酸配列を有する本発明のポリペプチドをコードする DNA の塩基配列を示す。

〔配列番号：10〕

15 後述の参考例 4 で用いられるプライマー b F 6 の塩基配列を示す。

〔配列番号：11〕

後述の参考例 4 で用いられるプライマー b F 7 の塩基配列を示す。

〔配列番号：12〕

後述の参考例 4 で用いられるプライマー b R 6 の塩基配列を示す。

20 〔配列番号：13〕

後述の参考例 4 で用いられるプライマー b R 7 の塩基配列を示す。

〔配列番号：14〕

後述の参考例 4 で得られた本発明のポリペプチドのアミノ酸配列（ウシ型）を示す。

25 〔配列番号：15〕

配列番号：14 で表わされるアミノ酸配列を含有する本発明のポリペプチドをコードする DNA の塩基配列を示す。

〔配列番号：16〕

後述の参考例 5 で用いられるプライマー r L P R 1 の塩基配列を示す。



〔配列番号：17〕

後述の参考例5で用いられるプライマーrLPF1の塩基配列を示す。

〔配列番号：18〕

- 5 後述の参考例5で得られた本発明のポリペプチドのアミノ酸配列（ラット型）を示す（リクローニング前）。

〔配列番号：19〕

配列番号：18で表わされるアミノ酸配列を含有する本発明のポリペプチドをコードするDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：20〕

- 10 RFGK配列をコードする塩基配列を示す。

〔配列番号：21〕

RFGK配列をコードする塩基配列を示す。

〔配列番号：22〕

RSRK配列をコードする塩基配列を示す。

- 15 〔配列番号：23〕

RSRK配列をコードする塩基配列を示す。

〔配列番号：24〕

RLGK配列をコードする塩基配列を示す。

〔配列番号：25〕

- 20 RLRK配列をコードする塩基配列を示す。

〔配列番号：26〕

後述の参考例6で用いられるプライマーFF2の塩基配列を示す。

〔配列番号：27〕

後述の参考例6で用いられるプライマーrR4の塩基配列を示す。

- 25 〔配列番号：28〕

後述の参考例6で用いられるプライマーmF1の塩基配列を示す。

〔配列番号：29〕

後述の参考例6で用いられるプライマーmF3の塩基配列を示す。

〔配列番号：30〕

後述の参考例 6 で用いられるプライマー m R 1 の塩基配列を示す。

〔配列番号： 3 1〕

後述の参考例 6 で用いられるプライマー moF の塩基配列を示す。

〔配列番号： 3 2〕

- 5 後述の参考例 6 で用いられるプライマー moR の塩基配列を示す。

〔配列番号： 3 3〕

後述の参考例 6 で得られた本発明のポリペプチドのアミノ酸配列（マウス型）を示す。

〔配列番号： 3 4〕

- 10 配列番号： 3 3 で表わされるアミノ酸配列を含有する本発明のポリペプチドをコードする DNA の塩基配列を示す。

〔配列番号： 3 5〕

後述の参考例 7 で得られたラット脳幹周辺部由来新規 G 蛋白質共役型レセプター蛋白質 r O T 7 T 0 2 2 L をコードする c DNA をクローニングするために使用したプライマー 1 の塩基配列を示す。

- 15

〔配列番号： 3 6〕

後述の参考例 7 で得られたラット脳幹周辺部由来新規 G 蛋白質共役型レセプター蛋白質 r O T 7 T 0 2 2 L をコードする c DNA をクローニングするために使用したプライマー 2 の塩基配列を示す。

- 20

〔配列番号： 3 7〕

後述の参考例 7 で得られたラット脳幹周辺部由来新規 G 蛋白質共役型レセプター蛋白質 r O T 7 T 0 2 2 L のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号： 3 8〕

後述の参考例 7 で得られたラット脳幹周辺部由来新規 G 蛋白質共役型レセプター蛋白質 r O T 7 T 0 2 2 L をコードする c DNA の塩基配列を示す。

- 25

〔配列番号： 3 9〕

後述の参考例 7（3）で得られたペプチドのアミノ酸配列を示す。

〔配列番号： 4 0〕

後述の参考例 7（4）で得られたペプチドのアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：41〕

後述の参考例7（5）で得られたペプチドのアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：42〕

- 5 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列の第81番目（Met）～第92番目（Phe）のアミノ酸配列を含有するペプチドをコードする塩基配列を示す。

〔配列番号：43〕

配列番号：1で表わされるアミノ酸配列の第101番目（Ser）～第112番目（Ser）のアミノ酸配列を含有するペプチドをコードする塩基配列を示す。

〔配列番号：44〕

- 10 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列の第124番目（Val）～第131番目（Phe）のアミノ酸配列を含有するペプチドをコードする塩基配列を示す。

〔配列番号：45〕

配列番号：1で表わされるアミノ酸配列の第1番目（Met）～第92番目（Phe）のアミノ酸配列を含有するペプチドをコードする塩基配列を示す。

- 15 〔配列番号：46〕

配列番号：1で表わされるアミノ酸配列の、第1番目（Met）～第112番目（Ser）のアミノ酸配列を含有するペプチドをコードする塩基配列を示す。

〔配列番号：47〕

- 20 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列の、第1番目（Met）～第131番目（Phe）のアミノ酸配列を含有するペプチドをコードする塩基配列を示す。

〔配列番号：48〕

参考例5で用いられたプライマーratF2の塩基配列を示す。

〔配列番号：49〕

参考例5で用いられたプライマーratRの塩基配列を示す。

- 25 〔配列番号：50〕

後述の参考例5で得られた本発明のポリペプチドのアミノ酸配列（ラット型）を示す（リクローニング後）。

〔配列番号：51〕

配列番号：50で表わされるアミノ酸配列を含有する本発明のポリペプチド

をコードするDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：52〕

参考例9で用いられたプライマーbFFの塩基配列を示す。

〔配列番号：53〕

- 5 参考例9で用いられたプライマーbFRの塩基配列を示す。

〔配列番号：54〕

参考例11で得られたhOT7T022で表されるタンパク質（ポリペプチド）をコードするアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：55〕

- 10 配列番号：54で表されるアミノ酸配列を含有するhOT7T022で表されるタンパク質（ポリペプチド）をコードするDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：56〕

配列番号：54で表されるアミノ酸配列を含有するhOT7T022で表されるタンパク質（ポリペプチド）をコードするDNAの塩基配列を示す。

- 15 〔配列番号：57〕

参考例11で用いられたプライマー1の塩基配列を示す。

〔配列番号：58〕

参考例11で用いられたプライマー2の塩基配列を示す。

〔配列番号：59〕

- 20 実施例A4で用いられたプライマー#1の塩基配列を示す。

〔配列番号：60〕

実施例A4で用いられたプライマー#2の塩基配列を示す。

〔配列番号：61〕

実施例A4で用いられたプライマー#3の塩基配列を示す。

- 25 〔配列番号：62〕

実施例A4で用いられたプライマー#4の塩基配列を示す。

〔配列番号：63〕

配列番号：1で表わされるアミノ酸配列の第104番目（Ala）～第131番目（Phe）のアミノ酸配列を含有するペプチドのアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：64〕

配列番号：1で表わされるアミノ酸配列の第104番目 (Ala) ～第131番目 (Phe) のアミノ酸配列を含有するペプチドをコードする塩基配列を示す。

〔配列番号：65〕

- 5 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列の第101番目 (Ser) ～第131番目 (Phe) のアミノ酸配列を含有するペプチドのアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：66〕

配列番号：1で表わされるアミノ酸配列の第101番目 (Ser) ～第131番目 (Phe) のアミノ酸配列を含有するペプチドをコードする塩基配列を示す。

- 10 〔配列番号：67〕

配列番号：14で表わされるアミノ酸配列の第104番目 (Ala) ～第131番目 (Phe) のアミノ酸配列を含有するペプチドのアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：68〕

- 15 配列番号：14で表わされるアミノ酸配列の第104番目 (Ala) ～第131番目 (Phe) のアミノ酸配列を含有するペプチドをコードする塩基配列を示す。

〔配列番号：69〕

- 20 配列番号：1または配列番号：12で表わされるアミノ酸配列の第127番目 (Leu) ～第131番目 (Phe) のアミノ酸配列を含有するペプチド：RFRP-3 (5) のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：70〕

配列番号：1または配列番号：12で表わされるアミノ酸配列の第126番目 (Asn) ～第131番目 (Phe) のアミノ酸配列を含有するペプチド：RFRP-3 (6) のアミノ酸配列を示す。

- 25 〔配列番号：71〕

配列番号：1または配列番号：12で表わされるアミノ酸配列の第125番目 (Pro) ～第131番目 (Phe) のアミノ酸配列を含有するペプチドRFRP-3 (7) のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：72〕

配列番号：1または配列番号：12で表わされるアミノ酸配列の第124番目 (Val) ～第131番目 (Phe) のアミノ酸配列を含有するペプチドRFRP-3 (8) のアミノ酸配列を示す。

5 後述の参考例2で得られた形質転換体 *Escherichia coli* JM109/p hRF1 は、1999年4月14日から日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6 (郵便番号305-8566) の独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター (旧：通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 (NIBH)) に寄託番号FERM BP-6702として、財団法人発酵研究所 (IFO) に1999年3月5日から寄託番号 IFO 16265として寄託されている。

10 後述の参考例7で得られた形質転換体エシェリヒア コリ (*Escherichia coli*) DH10B/p AK-r OT022Lは、1998年11月2日から独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター (旧NIBH) に寄託番号FERM BP-6558として、1998年10月16日から財団法人・発酵研究所 (IFO) に寄託番号 IFO 16211として寄託されている。

15 後述の参考例9で得られた形質転換体 *Escherichia coli* JM109/pbRF2 は、1999年8月2日から独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター (旧NIBH) に寄託番号FERM BP-6811として、財団法人発酵研究所 (IFO) に1999年6月18日から寄託番号 IFO 16288として寄託されている。

20 後述の参考例8で得られた形質転換体 *Escherichia coli* JM109/phRF2 は、1999年8月2日から独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター (旧NIBH) に寄託番号FERM BP-6812として、財団法人発酵研究所 (IFO) に1999年6月18日から寄託番号 IFO 16289として寄託されている。

25 後述の参考例6で得られた形質転換体 *Escherichia coli* JM109/pmLP4 は、1999年8月2日から独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター (旧NIBH) に寄託番号FERM BP-6813として、財団法人発酵研究所 (IFO) に1999年6月18日から寄託番号 IFO 162

90として寄託されている。

後述の参考例5で得られた形質転換体 *Escherichia coli* JM109/prLPL6 は、  
1999年8月2日から独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託セ  
ンター（旧NIBH）に寄託番号FERM BP-6814として、財団法人  
5 発酵研究所（IFO）に1999年6月18日から寄託番号 IFO 162  
91として寄託されている。

後述の参考例11で得られた形質転換体 *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  /  
pCR2.1-hOT022T は、1999年11月8日から独立行政法人産業技術総合研  
究所 特許生物寄託センター（旧NIBH）に寄託番号FERM BP-69  
10 30として、財団法人発酵研究所（IFO）に1999年10月27日から  
寄託番号IFO16330として寄託されている。

後述の参考例11で得られた形質転換体 *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  /  
pCR2.1-hOT022G は、1999年11月8日から独立行政法人産業技術総合研  
究所 特許生物寄託センター（旧NIBH）に寄託番号FERM BP-69  
15 31として、財団法人発酵研究所（IFO）に1999年10月27日から  
寄託番号IFO16331として寄託されている。

後述の実施例A5で得られた形質転換体 *Escherichia coli*  
MM294(DE3)/pTFCRFRP-1は、2000年9月28日から独立行政法人産業技術  
総合研究所 特許生物寄託センター（旧NIBH）に受託番号FERM BP  
20 -7313として、財団法人発酵研究所（IFO）に2000年9月19日か  
ら寄託番号IFO 16476として寄託されている。

後述の参考例12で得られた抗ラット型RFRP-1モノクローナル抗体を産生  
するIF3は、2001年2月21日から独立行政法人産業技術総合研究所  
特許生物寄託センター（旧NIBH）に受託番号FERM BP-7463と  
25 して、財団法人発酵研究所（IFO）に2001年1月16日から寄託番号  
IFO 50527として寄託されている。

#### 実施例

以下に、参考例および実施例を挙げて本発明をさらに具体的に説明するが、  
本発明はそれに限定されるものではない。なお、大腸菌を用いての遺伝子操

作法は、モレキュラー・クローニング (Molecular cloning) に記載されている方法に従った。

参考例 1 ヒト胎児脳poly(A)<sup>+</sup>RNA画分からのcDNAの合成とRT-PCR法による生理活性ペプチドcDNAの増幅

- 5 クローンテック社より購入したヒト胎児脳poly(A)<sup>+</sup>RNA画分1 $\mu$ gにプライマーとしてOligod Tプライマー (GibcoBRL社) を加え、モロニ Maus 白血病ウイルスの逆転写酵素 (GibcoBRL社) により、添付バッファを用いてcDNAを合成した。反応後の産物はフェノール:クロロホルム (1 : 1) で抽出し、エタノール沈殿を行った後、30 $\mu$ lのTEに溶解した。調製したcDNA 1 $\mu$ lを鋳型として、次の2つのプライマー (F5およびF6) を用いて、PCRによる増幅を行った。

F5 : 5'-GGGCTGCACATAGAGACTTAATTTTAG-3' (配列番号 : 3)

F6 : 5'-CTAGACCACCTCTATATACTGCCCAT-3' (配列番号 : 4)

- 反応液の組成は、合成DNAプライマー (F5およびF6) 各20 pM、  
15 0.25 mM dNTPs、Ex Taq DNA polymerase 0.5 $\mu$ lおよび酵素に付属のバッファ5 $\mu$ lで、総反応溶液量は50 $\mu$ lとした。増幅のためのサイクルはサーマルサイクラー (パーキン・エルマー) を用い98 $^{\circ}$ C・10秒、63 $^{\circ}$ C・20秒、72 $^{\circ}$ C・40秒のサイクルを40回繰り返した。

- 20 さらにそのPCR産物の1 $\mu$ lを鋳型として次の2つのプライマー (F1およびR5) を用いて、nested PCRによる増幅を行った。

F1 : 5'-GCACATAGAGACTTAATTTTAGATTAGAC-3' (配列番号 : 5)

R5 : 5'-CATGCACTTTGACTGGTTTCCAGGTAT-3' (配列番号 : 6)

- 反応液の組成は、合成DNAプライマー (F1およびR5) 各20 pM、  
25 0.25 mM dNTPs、Ex Taq DNA polymerase 0.5 $\mu$ lおよび酵素に付属のバッファ5 $\mu$ lで、総反応溶液量は50 $\mu$ lとした。増幅のためのサイクルはサーマルサイクラー (パーキン・エルマー社) を用い98 $^{\circ}$ C・10秒、60 $^{\circ}$ C・20秒、72 $^{\circ}$ C・40秒のサイクルを40回繰り返した。増幅産物の確認は1.2%アガロース電気泳動およびエチジウムブ



ロミド染色によって行った。

参考例2 PCR産物のプラスミドベクターへのサブクローニングおよび挿入cDNA部分の塩基配列の解読による新規生理活性ペプチド候補クローンの選択

- 5 参考例1で行ったPCR後の反応産物は1.2%のアガロースゲルを用いて分離し、目的とする大きさのDNA断片の増幅を確認した後、Quiagen PCR purification kit (Quiagen) を用いてDNAを回収した。TAクローニングキット (インビトロゲン社) の処方に従い、回収したDNAをプラスミドベクターpCR<sup>TM</sup>2.1へサブクローニングした。これを大腸菌JM109
- 10 competent cell (宝酒造) に導入して形質転換したのち、cDNA挿入断片を持つクローンをアンピシリン、IPTGおよびX-galを含むLB寒天培地中で選択し、白色を呈するクローンのみを滅菌した爪楊枝を用いて分離し、形質転換体エシェリヒア コリ (Escherichia coli) JM109/p hRF1を得た。
- 15 個々のクローンをアンピシリンを含むLB培地で一晚培養し、自動プラスミド抽出装置 (クラボウ) を用いてプラスミドDNAを調製した。調製したDNAの一部を用いてEcoRIによる切断を行い、挿入されているcDNA断片の大きさを確認した。残りのDNAの一部をさらにRNase処理、フェノール・クロロホルム抽出し、エタノール沈殿によって濃縮した。塩基
- 20 配列の決定のための反応はDyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit (ABI社) を用いて行い、蛍光式自動シーケンサーを用いて解読した。得られた塩基配列の情報は、DNASIS (日立システムエンジニアリング社) を用いて行った。決定した塩基配列を図1に示した。

- 25 決定した塩基配列を図1をもとにホモロジー検索と配列の解析を行った結果、形質転換体E. coli JM109/p hRF1の保有するプラスミドに挿入されたcDNA断片は、新規生理活性ペプチドをコードすることが分かった。

参考例3 ヒト胎児脳cDNAからの生理活性ペプチドcDNAのスプライシングバリエーションの取得

参考例1で作製したヒト胎児脳cDNA 1 mlを鋳型として、次の二つのプライ

マー (F5、hR1) を用いてPCRによる増幅を行った。

F5: 5'-GGGCTGCACATAGAGACTTAATTTTAG-3' (配列番号: 3)

hR1: 5'-CAGCTTTAGGGACAGGCTCCAGGTTTC-3' (配列番号: 7)

反応液の組成は合成プライマー (F5およびhR1) 各20 pM、0.25 mM dNTPs、

- 5 Ex Taq DNA polymerase 0.5 mlおよび酵素に付属のバッファーで総反応液量は50 mlとした。増幅のためのサイクルはサーマルサイクラー (パーキンエルマー) を用い、98℃・10秒、65℃・20秒、72℃・20秒のサイクルを40回くりかえした。増幅産物の確認は1.2%アガロース電気泳動およびエチジウムブロミド染色によって行った。PCR産物の増幅を確認した後、反応産物をQIA quick
- 10 PCR purification Kit (Quiagen) を用いて精製し、配列決定を行った。塩基配列決定のための反応はBigDye Deoxy Terminator Cycle Sequence Kit (ABI) を用いて行い、蛍光式自動Sequencer (ABI377) を用いて解読した。得られた塩基配列の情報解析はDNASIS (日立システムエンジニアリング) を用いて行った。その結果、参考例2で得られたcDNAと3'末端側が異なるcDNAが得られた。
- 15 したがって本参考例で得られたcDNAは、参考例2で得られたcDNAのスプライシングバリエーションである事が分かった。決定した塩基配列 (配列番号: 9) と予測されるアミノ酸の配列 (配列番号: 8) を図3に示す。

参考例4 ウシ視床下部poly(A)<sup>+</sup>RNAからの生理活性ペプチドcDNAの取得

ウシ視床下部poly(A)<sup>+</sup>RNAからのウシ型生理活性ペプチドcDNAの取得は

- 20 Marathon cDNA Amplification Kit (Clontech) を用いて行った。Kitに添付のマニュアルにしたがって作製した牛視床下部cDNAを鋳型として、次の4つのプライマー (bF6、bF7、bR6、bR7) を合成し、Kit添付のAP1、AP2の二種類のプライマーと組み合わせてPCRによる増幅を行った。

bF6: 5'-GCCTAGAGGAGATCTAGGCTGGGAGGA-3' (配列番号: 10)

- 25 bF7: 5'-GGGAGGAACATGGAAGAAGAAAGGAGC-3' (配列番号: 11)

bR6: 5'-GATGGTGAATGCATGGACTGCTGGAGC-3' (配列番号: 12)

bR7: 5'-TTCCTCCCAAATCTCAGTGGCAGGTTG-3' (配列番号: 13)

5'側(N末領域)の増幅のために、まず一回目のPCR反応を合成プライマー (bR6とAP1) を用いて行った。各プライマー 20pMと0.25mMdNTPs、Klen Taq DNA

- polymerase 0.5mlおよび酵素に付属のバッファーで総反応液量は25mlとした。増幅のためのサイクルはサーマルサイクラー（パーキンエルマー）を用い、98℃10秒、72℃2分のサイクルを5回、続いて98℃・10秒、70℃・2分のサイクルを5回、98℃・10秒、68℃・2分30秒のサイクルを25回くりかえした。次にその一回目のPCR反応液を10倍に希釈し、その1mlを鋳型にして（bR7とAP2）プライマーにて二回目のPCRを行った。各プライマー 20pMと0.25mM dNTPs、Klen Taq DNA polymerase 0.5mlおよび酵素に付属のバッファーで総反応液量は25mlとした。増幅のためのサイクルはサーマルサイクラー（パーキンエルマー）を用い、98℃・10秒、72℃・2分のサイクルを5回、続いて98℃・10秒、70℃・2分のサイクルを5回、98℃・10秒、68℃・2分30秒のサイクルを35回くりかえした。
- 3'側（C末領域）の増幅のために、まず一回目のPCR反応を合成プライマー（bF6とAP1）を用いて行った。各プライマー 20pMと0.25mM dNTPs、Klen Taq polymerase 0.5mlおよび酵素に付属のバッファーで総反応液量は25mlとした。増幅のためのサイクルはサーマルサイクラー（パーキンエルマー）を用い、98℃・10秒、72℃・2分のサイクルを5回、続いて98℃・10秒、70℃・2分のサイクルを5回、98℃・10秒、68℃・2分30秒のサイクルを25回くりかえした。次にその一回目のPCR反応液を10倍に希釈し、その1mlを鋳型にして（bF7とAP2）プライマーにて二回目のPCRを行った。各プライマー 20pMと0.25mM dNTPs、Klen Taq DNA polymerase 0.5mlおよび酵素に付属のバッファーで総反応液量は25mlとした。増幅のためのサイクルはサーマルサイクラー（パーキンエルマー）を用い、98℃・10秒、72℃・2分のサイクルを5回、続いて98℃・10秒、70℃・2分のサイクルを5回、98℃・10秒、68℃・2分30秒のサイクルを35回くりかえした。5'側、3'側それぞれの増幅産物の確認は1.2%アガロース電気泳動およびエチジウムブロミド染色によって行った。PCR産物の増幅を確認した後、反応産物をQIA quick PCR purification Kit（Quiagen）を用いて精製し、配列決定を行った。塩基配列決定のための反応はBig Dye Deoxy Terminator Cycle Sequence Kit（ABI）を用いて行い、蛍光式自動Sequencer（ABI377）を用いて解読した。

得られた塩基配列の情報解析はDNASIS（日立システムエンジニアリング）を用いて行った。決定した塩基配列（配列番号：15）と予測されるアミノ酸の配列（配列番号：14）を図4に示す。

参考例5 ラット脳poly(A)<sup>+</sup>RNAからの生理活性ペプチドcDNAの取得

- 5     ラット脳poly(A)<sup>+</sup>RNAからのラット型生理活性ペプチドcDNAの取得は Marathon cDNA Amplification Kit (Clontech) を用いて行った。Kitに添付のマニュアルにしたがって作製したラット脳cDNAを鋳型として、次の2つのプライマー

rLPR1: 5'-CCCTGGGGCTTCTTCTGTCTTCTATGT-3'（配列番号：16）

- 10    rLPF1: 5'-AGCGATTCATTTTATTGACTTTAGCA-3'（配列番号：17）

を合成し、Kit添付のAP1、AP2の二種類のプライマーと組み合わせてPCRによる増幅を行った。

- 5'側（N末領域）の増幅のために、まず一回目のPCR反応をrLPR1とAP1のプライマーセットを用いて行った。各プライマー 200pMと各0.1mM dNTP、Klen Taq  
15    DNA polymerase 0.25mlおよび酵素に付属のバッファーで総反応液量は25mlとした。増幅のためのサイクルはサーマルサイクラー（パーキンエルマー）を用い、98℃・10秒、72℃・2分のサイクルを5回、続いて98℃・10秒、70℃・2分のサイクルを5回、98℃・10秒、68℃・2分30秒のサイクルを25回くりかえした。次にその一回目のPCR反応液を鋳型にして一回目のプライマーセット、  
20    同様の反応液組成にて二回目のPCRを行った。増幅のためのサイクルは、98℃・10秒、72℃・2分のサイクルを5回、続いて98℃・10秒、70℃・2分のサイクルを5回、98℃・10秒、（68℃・2分30秒）のサイクルを38回くりかえした。

- 3'側（C末領域）の増幅のために、まず一回目のPCR反応をrLPF1とAP1のプライマーセットを用いて行った。反応液組成は5'側（N末領域）の増幅の場合と同様とした。増幅のためのサイクルは、98℃・10秒、72℃・2分のサイクルを5回、続いて98℃・10秒、70℃・2分のサイクルを5回、98℃・10秒、65℃・20秒、72℃・2分のサイクルを25回くりかえした。次にその一回目のPCR反応液を鋳型にしてrLPF1とAP2プライマーにて二回目のPCRを行った。反応液組成
- 25

- は一回目のPCRと同様とした。増幅のためのサイクルはサーマルサイクラー（パーキンエルマー）を用い、98℃・10秒、72℃・2分のサイクルを5回、続いて98℃・10秒、70℃・2分のサイクルを5回、98℃・10秒、65℃・20秒、72℃・2分のサイクルを38回くりかえした。5'側、3'側それぞれの増幅産物の確認は
- 5 1. 2%アガロース電気泳動およびエチジウムブロミド染色によって行った。PCR産物バンドをQIA quick Gel Extraction Kit (Quiagen) を用いて精製し、配列決定を行った。塩基配列決定は参考例3と同様の方法で行った。決定した塩基配列（配列番号：19）と予測されるアミノ酸の配列（配列番号：18）を図5に示す。さらにこの配列をもとに、開始コドンと終止コドンの周辺に2
- 10 本のプライマー
- ratF2：5'-AATGGAAATTATTTTCATCAAAGCGATTTCAT-3'（配列番号：48）
- ratR：5'-CACCTATACTGACAGGAATGATGGCTCTCC-3'（配列番号：49）
- を合成した。ラット視床下部poly(A)<sup>+</sup>RNAよりAMV reverse transferase（宝酒造）とrandom 9 mer（宝酒造）を用いて合成したcDNAを鋳型として98℃・10
- 15 秒、68℃・40秒のサイクルを33回くりかえすPCR反応を行った。さらにこの反応液を鋳型として98℃・10秒、68℃・1分のサイクルを38回くりかえすPCR反応を行い、約690bpのPCR産物を得た。これをTA cloning Kit（Invitrogen）のマニュアルにしたがってクローニングベクターpCR2.1 TOP0へ導入、大腸菌JM109に導入して形質転換体E. coli JM109/prLPL6を得
- 20 た。参考例3と同様の方法で塩基配列を決定し（配列番号：51）、アミノ酸配列（配列番号：50）を予測した。
- 参考例6 マウス脳poly(A)<sup>+</sup>RNAからのMarathon PCR法によるマウス型生理活性ペプチドcDNAの取得と配列確認
- マウス脳poly(A)<sup>+</sup>RNAからマウス型生理活性ペプチドcDNAを取得するため、
- 25 まずマウス脳poly(A)<sup>+</sup>RNA 1 μgをoligo d(T) primer 2.5 pmol（宝酒造）、0.5 mM dNTPs, 10 mM DTT存在下で、SuperScriptII RNase H<sup>-</sup> 逆転写酵素（GIBCO BRL）により、42℃、1時間の反応でcDNAを合成した。これを鋳型として、プライマー
- FF2：5'-GACTTAATTTTAGATTAGACAAAATGGAA-3'（配列番号：26）

rR4 : 5'-TTCTCCCAAACCTTTGGGGCAGGTT-3' (配列番号 : 27)

および、KlenTaq DNA polymerase (Clontech) を用いて、98℃ 10秒、56℃ 20秒、72℃ 25秒のサイクルを39回くりかえすPCR反応を行った。さらに同じプライマーセットを用いて98℃ 10秒、60℃ 20秒、72℃ 25秒のサイクルを25回くりかえすPCR反応を行い、増副産物を2%アガロース電気泳動およびエチジウムブロミド染色によって検出して、そのバンドをQIA quick Gel Extraction Kit (Quiagen) を用いて精製、参考例3と同様の方法で塩基配列を決定した。得られたマウス型生理活性ペプチドcDNA断片の5'および3'側の配列を取得するため、参考例5と同様に、Marathon cDNA Amplification Kit (Clontech) を用いてマウス脳poly(A)<sup>+</sup>RNA 1 μg からcDNAを合成し、鋳型とした。次の3つのプライマー

mF1 : 5'-ACAGCAAAGAAGGTGACGGAAAATACTC-3' (配列番号 : 28)

mF3 : 5'-ATAGATGAGAAAAGAAGCCCCGCAGCAC-3' (配列番号 : 29)

mR1 : 5'-GTGCTGCGGGGCTTCTTTTCTCATCTAT-3' (配列番号 : 30)

を合成し、kit付属のAP1プライマーと組み合わせてPCRを行った。

5'側 (N末領域) の増幅のために、まず一回目のPCR反応をmR1とAP1のプライマーセットを用いて行った。3'側 (C末領域) の増幅のためには、一回目のPCR反応をmF1とAP1のプライマーセットで行った。各プライマー 200pMと各0.1mM dNTP、Klen Taq polymerase 0.25mlおよび酵素に付属のバッファーで総反応液量は25mlとした。増幅のためのサイクルは98℃ 10秒、72℃ 2分のサイクルを5回、続いて98℃ 10秒、70℃ 2分のサイクルを5回、98℃ 10秒、68℃ 2分30秒のサイクルを25回くりかえした。次にその一回目のPCR反応液を鋳型にして二回目のPCRを行った。5'側の増幅は一回目と同様のプライマーセット、3'側の増幅はmF3とAP1プライマーセットを用い、一回目のPCRと同様の反応液組成で反応液を調製した。PCR反応は98℃ 10秒、72℃ 2分のサイクルを5回、続いて98℃ 10秒、70℃ 2分のサイクルを5回、98℃ 10秒、68℃ 2分30秒のサイクルを38回くりかえした。

5'側、3'側それぞれの増幅産物の確認は1.2%アガロース電気泳動およびエチジウムブロミド染色によって行った。PCR産物のバンドをQIA quick Gel

Extraction Kit (Quiagen) を用いて精製し、配列決定を行った。塩基配列決定は参考例3と同様の方法で行った。

さらに得られた配列をもとに2つのプライマー

moF: 5'-TTTAGACTTAGACGAAATGGA-3' (配列番号: 3 1)

5 moR: 5'-GCTCCGTAGCCTCTTGAAGTC-3' (配列番号: 3 2)

を合成し、先に示した、マウス脳poly(A)<sup>+</sup>RNAよりSuperScriptII RNase H<sup>-</sup> 逆転写酵素で合成したcDNAを鋳型としてPCRを行い、マウス型生理活性ペプチド全長cDNAを含む断片を増幅した。反応はKlenTaq DNA polymerase (Clontech) を用いて、98℃ 10秒、56℃ 20秒、72℃ 15秒のサイクルを35回くりかえした。

10 約600bpの増副産物を2%アガロース電気泳動およびエチジウムブロミド染色によって検出し、そのバンドをQIA quick Gel Extraction Kit (Quiagen) を用いて精製、クローニングベクター pCR2.1-TOPO (TOPO TA cloning kit、Invitrogen)へサブクローニング、大腸菌JM109へ導入し、形質転換体E. coli JM109/ pmLP4を得た。参考例3と同様の方法で塩基配列を解析し、決定した塩

15 基配列 (配列番号: 3 4) と予測されるアミノ酸配列 (配列番号: 3 3) を図7に示す。

#### 参考例7

(1) ラット脳幹周辺部のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするcDNAのクローニングと塩基配列の決定

20 ラット脳幹周辺部cDNAを鋳型とし、2個のプライマー、プライマー1 (配列番号: 3 5) およびプライマー2 (配列番号: 3 6) を用いてPCR反応を行った。該反応における反応液の組成は上記cDNAの10分の1量を鋳型として使用し、Advantage cDNA Polymerase Mix (CLONTECH社) 1/50量、プライマー1 (配列番号: 3 5)

25 およびプライマー2 (配列番号: 3 6) を各0.2μM、dNTPs 200μM、および酵素に添付のバッファーを加え、50μlの液量とした。PCR反応は、① 94℃・2分の後、② 94℃・30秒、72℃・2分のサイクルを3回、③ 94℃・30秒、68℃・2分のサイクルを3回、④ 94℃・30秒、64℃・30秒、68℃2分のサイクルを30回繰り返し、

⑤ 最後に68℃・8分の伸長反応を行った。該PCR反応後の反応産物をT  
Aクローニングキット(Invitrogen社)の処方に従いプラスミドベ  
クターpCR2.1(Invitrogen社)へサブクローニングした。これ  
を大腸菌DH5αに導入し、cDNAをもつクローンをアンピシリンを含  
むLB寒天培地中で選択した後、個々のクローンの配列を解析した結果、新  
規G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするcDNA配列(配列番号:  
38)を得た。このcDNAより導き出されるアミノ酸配列(配列番号:3  
7)を含有する新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質をrOT7T022L  
と命名した。

10 本発明のラット脳幹周辺部由来のG蛋白質共役型レセプター蛋白質rOT  
7T022LをコードするcDNA(配列番号:38)がサブクローニング  
されたプラスミドpAK-rOT022Lを、自体公知の方法に従い大腸菌  
(*Escherichia coli*)DH10Bに導入して、形質転換体:大腸菌(*Escherichia*  
*coli*)DH10B/pAK-rOT022Lを得た。

15 (2) G蛋白質共役型レセプター蛋白質rOT7T022L発現CHO細胞  
の樹立

直径10cmの組織培養用シャーレに $1 \times 10^6$ 個のCHOdhfr<sup>-</sup>細胞を  
播種し、24時間培養した。(1)で得られたrOT7T022L発現ベク  
ターpAK-rOT022Lを20μg用い、リボソーム法による遺伝子導  
入キット(ジーントランスファー、ニッポンジーン社)を用いて、DNA・  
リボソームの複合体を形成させた。培地を新鮮なものに交換し、これにDN  
A・リボソームの複合体を添加して一晩インキュベートした。培地を新鮮な  
ものと交換してさらに1日間培養した後、形質転換体選択用の培地に交換し  
て2日間培養した。さらに、トリプシン-EDTA処理によってシャーレ内  
の細胞を回収し、細胞密度が希薄な状態にて再培養を行うことによって、形  
質転換体の割合の増加を図った。これにより、rOT7T022Lを安定に  
高発現する細胞株CHO-rOT7T022Lのクローンを得た。

(3) Met-Pro-His-Ser-Phe-Ala-Asn-Leu-Pro-Leu-Arg-Phe-NH<sub>2</sub>(配列番号:  
39)の合成



市販 p-メチルBHA樹脂（アプライド バイオシテムズ、現パーキンエルマー社製）0.5 mmole分をペプチド合成機（アプライド バイオシテムズ社製430A）の反応器に入れ、DCMで膨潤させた後、最初のアミノ酸 Boc-PheをHOBt/DCC法で活性化し p-メチルBHA樹脂に導入した。樹脂を  
 5 50% TFA / DCMで処理し、Boc基を除去してアミノ基を遊離させ、DIEAで中和した。このアミノ基に次のアミノ酸Boc-Arg(Tos)をHOBt/DCC法で縮合した。未反応アミノ基の有無をニンヒドリンテストで調べ反応完了を確認後同様に、Boc-Leu、Boc-Pro、Boc-Leu、Boc-Asn、Boc-Ala、Boc-Phe、Boc-Ser(Bzl)、Boc-His(Bom)、Boc-Pro、Boc-Metを順次縮合した。

- 10 全配列アミノ酸が導入され樹脂を50% TFA / DCMで処理し樹脂上のBoc基を除去後、樹脂を乾燥して、Met-Pro-His(Bom)-Ser(Bzl)-Phe-Ala-Asn-Leu-Pro-Leu-Arg(Tos)-Phe-pMBHA-resin 0.73gを得た。

- この樹脂0.25gをp-クレゾール5.1g、弗化水素15mlと共にテフロン製弗化  
 15 水素反応装置中で0℃・60分間反応させた。弗化水素を減圧留去し、残留物にジエチルエーテル100mlを加え攪拌後、グラスフィルター上に濾取、乾燥した。これを50%酢酸水溶液50ml中に懸濁、攪拌し、ペプチドを抽出した後樹脂と分離し減圧下に約5mlまでに濃縮した後、セファデックスG-25（2 x 90 cm）のカラムに付し50%酢酸水で展開し主要画分を集め凍結乾燥した。次  
 20 にこの粗精製ペプチドを5%チオグリコール酸/50%酢酸1.5mlに溶解し、50℃ 12時間保持しMet酸化体ペプチドを還元した後、LiChroprep（商品名）RP-18（MERCK社製）を充填した逆相系カラムにつけ0.1% TFA水と0.1% TFA含有33%アセトニトリル水溶液を用いたグラジエント溶出での精製をくり返し、アセトニトリル濃度27%前後に溶出される部分を集め凍  
 25 結乾燥し、白色粉末26mgを得た。

質量分析による (M+H)<sup>+</sup> 1428.7 （理論値 1428.8）

HPLC溶出時間 18.0分

カラム条件

カラム: Wakosil（商品名）5C18 （4.6 x 100mm）

溶離液：A液（0.1% TFA含有5%アセトニトリル水）

B液（0.1% TFA含有55%アセトニトリル水）を用い

A液からB液へ直線型濃度勾配溶出（25分）

流速：1.0 ml/分

5 (4) Val-Pro-Asn-Leu-Pro-Gln-Arg-Phe-NH<sub>2</sub>（配列番号：40）の合成

上述の参考例7（3）と同様にして、Boc-Phe, Boc-Arg(Tos), Boc-Gln, Boc-Pro, Boc-Leu, Boc-Asn, Boc-Pro, Boc-Valを順次縮合し、

Boc-Val-Pro-Asn-Leu-Pro-Gln-Arg(Tos)-Phe-pMBHA-resin 0.43gを得た。この樹脂0.22gを同様に弗化水素処理、カラムクロマト精製し白色粉末の目的物  
10 46mgを得た。

質量分析による (M+H)<sup>+</sup> 969.5（理論値 969.6）

HPLC溶出時間 11.8分

カラム条件

カラム：Wakosil（商品名）5C18（4.6 x 100 mm）

15 溶離液：A液（0.1% TFA含有5%アセトニトリル水）

B液（0.1% TFA含有55%アセトニトリル水）を用い

A液からB液へ直線型濃度勾配溶出（25分）

流速：1.0 ml/分

(5) Ser-Ala-Gly-Ala-Thr-Ala-Asn-Leu-Pro-Arg-Ser-NH<sub>2</sub>（配列番号：41）

20 の合成

上述の参考例7（3）と同様にして、Boc-Ser(Bzl), Boc-Arg(Tos), Boc-Leu, Boc-Pro, Boc-Leu, Boc-Asn, Boc-Ala, Boc-Thr(Bzl), Boc-Ala, Boc-Gly, Boc-Ala, Boc-Ser(Bzl)を順次縮合し、

Boc-Ser(Bzl)-Ala-Gly-Ala-Thr(Bzl)-Ala-Asn-Leu-Pro-Leu-Arg(Tos)-Ser(Bzl)-pMBHA-resin 0.62gを得た。この樹脂0.23gを同様に弗化水素処理、カラムクロマト精製し白色粉末の目的物71mgを得た。  
25

質量分析による (M+H)<sup>+</sup> 1156.4（理論値 1156.6）

HPLC溶出時間 11.8分

カラム条件

カラム：Wakosil（商品名） 5 C 1 8 （4. 6 x 1 0 0 mm）

溶離液：A液（0.1% T F A含有5 %アセトニトリル水）

B液（0.1% T F A含有5 5 %アセトニトリル水）を用い

A液からB液へ直線型濃度勾配溶出（2 5分）

5 流速： 1.0 m l / 分

（6）rOT7T022L（配列番号：3 7）とペプチドMPHSFANLPLRFamide（配列番号：3 9）およびペプチドVPNLPQRFamide（配列番号：4 0）のサイトセンサーによる反応実験

上述の参考例7（2）で得られたrOT7T022L受容体発現CHO細胞を、2.7  
10  $\times 10^5$  cells/capsuleの密度でサイトセンサー用カプセルに播種し、一晚培養  
した後にサイトセンサーのワークステーションに装着した。サイトセンサー  
の流路にセットしたアッセイ用の培地（0.1%のウシ血清アルブミンを含有する  
low buffered RPMI1640 medium）を、ポンプON（80秒間）ポンプOFF  
（40秒間）のサイクルで細胞に供給し、各サイクルごとにポンプ停止8秒後  
15 から30秒間の細胞外pHの変化率をacidification rateとして算出した。  
acidification rateの経時変化をモニターし、安定した値を示すようになった  
ところで流路の切り換えによって細胞に各ペプチドを7分2秒間暴露した。  
各ウェルのAcidification Rateの値をペプチドを暴露する直前の3サイクル  
の値を100%として標準化し、細胞の反応の比較を行なったところ、rOT7T022  
20 L発現CHO細胞はペプチドMPHSFANLPLRFamide（配列番号：3 9）およびペプチドVPNLPQRFamide（配列番号：4 0）  
に対して強く用量依存的な反応を示す事が明らかになった（図8）。

参考例8 ヒト新規生理活性ペプチド候補スプライシングバリエーションcDNAを  
保持する形質転換体の作成

25 上記参考例3で行ったPCR後の反応産物は1. 2%のアガロースゲルを  
用いて分離し、目的とする大きさのDNA断片の増幅を確認した後、Quiagen  
PCRpurification kit（Quiagen）を用いてDNAを回収した。TAクロー  
ニングキット（インビトロゲン社）の処方に従い、回収したDNAをプラス  
ミドベクターpCR<sup>TM</sup>2.1へサブクローニングした。これを大腸菌JM109

- competent cell (宝酒造) に導入して形質転換したのち、cDNA挿入断片を持つクローンをアンピシリン、IPTGおよびX-galを含むLB寒天培地中で選択し、白色を呈するクローンのみを滅菌した爪楊枝を用いて分離した。個々のクローンをアンピシリンを含むLB培地で一晚培養し、自動プラスミド抽出装置 (クラボウ) を用いてプラスミドDNAを調製した。調製したDNAの一部を用いてEcoRIによる切断を行い、挿入されているcDNA断片の大きさを確認した。残りのDNAの一部をさらにRNase処理、フェノール・クロロホルム抽出し、エタノール沈殿によって濃縮した。塩基配列の決定のための反応はDyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit (ABI社) を用いて行い、蛍光式自動シーケンサーを用いて解読し、形質転換体エシェリヒア コリ (Escherichia coli) JM109/p hRF2を得た。

#### 参考例9 ウシ新規生理活性ペプチドcDNAを保持する形質転換体の作成

- 参考例4で作製したウシ視床下部cDNA 1 mlを鋳型として、次の二つのプライマー (bFF、bFR) を用いてPCRによる増幅を行った。

bFF: 5'-TTCTAGATTTTGGACAAAATGGAAATT-3' (配列番号: 52)

bFR: 5'-CGTCTTTAGGGACAGGCTCCAGATTTC-3' (配列番号: 53)

- 反応液の組成は合成プライマー (bFFおよびbFR) 各20 pM、0.25 mM dNTPs、Ex Taq DNA polymerase 0.5 mlおよび酵素に付属のバッファーで総反応液量は50 mlとした。増幅のためのサイクルはサーマルサイクラー (パーキンエルマー) を用い、98℃・10秒、65℃・20秒、72℃・20秒のサイクルを40回くりかえした。増幅産物の確認は1.2%アガロース電気泳動およびエチジウムブロミド染色によって行った。参考例3で行ったPCR後の反応産物は1.2%のアガロースゲルを用いて分離し、目的とする大きさのDNA断片の増幅を確認した後、Quiagen PCR purification kit (Quiagen) を用いてDNAを回収した。TAクローニングキット (インビトロゲン社) の処方に従い、回収したDNAをプラスミドベクター pCR<sup>TM</sup>2.1へサブクローニングした。これを大腸菌 JM109 competent cell (宝酒造) に導入して形質転換したのち、cDNA挿入断片を持つクローンをアンピシリン、IPTGおよびX-gal

1を含むLB寒天培地中で選択し、白色を呈するクローンのみを滅菌した爪楊枝を用いて分離した。個々のクローンをアンピシリンを含むLB培地で一晚培養し、自動プラスミド抽出装置（クラボウ）を用いてプラスミドDNAを調製した。調製したDNAを用いてEcoRIによる切断を行い、挿入されているcDNA断片の大きさを確認した。さらに調製したDNAをRNase処理、フェノール・クロロホルム抽出し、エタノール沈殿によって濃縮した。塩基配列の決定のための反応はDyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit（ABI社）を用いて行い、蛍光式自動シーケンサーを用いて解読し、形質転換体エシエリヒア コリ（Escherichia coli）JM109/pbRF2を得た。

参考例10 ペプチドMPHSFANLPLRFamide（配列番号：39）およびペプチドVPNLPQRFamide（配列番号：40）のrOT7T022L（配列番号：37）発現CHO細胞に対するcAMP産生抑制活性

参考例7（3）および（4）で合成したペプチドMPHSFANLPLRFamide（配列番号：39）、VPNLPQRFamide（配列番号：40）がrOT7T022L受容体に対して特異的に反応することが参考例7（6）のサイトセンサーによる実験で確認できた。次に上述したペプチドのrOT7T022L発現CHO細胞に対するcAMP産生抑制活性の測定を行った。

参考例7（2）で得られたrOT7T022L発現CHO細胞を $1.0 \times 10^5$  cells/wellの濃度で24wellプレートに巻き、37℃で2日間培養した。ハンクスバッファー（HBSS）に0.05% BSAと0.2mM IBMXを加えたバッファーで細胞を洗浄したのち、同じバッファーで30分間・37℃で放置した。30分後細胞を上記のバッファーに Forskolin  $10^{-8}$  Mを加えたアッセイバッファーと同時にさまざまな濃度の上述したペプチドを添加し、37℃・30分間インキュベーションをした。

30分後各wellの細胞内のcAMP濃度をcAMP EIA Kit（アマシャム社）の方法にしたがって測定した。その結果、図9に示すようにペプチドMPHSFANLPLRFamide（配列番号：39）、VPNLPQRFamide（配列番号：40）はrOT7T022L受容体発現CHO細胞に対してcAMP産成抑制効果を示し、その $IC_{50}$ 値はそれぞれ0.5nM、0.7nMと非常に低濃度で強い効果を示した。

参考例 1 1 ヒト視床下部のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードする cDNA のクローニングと塩基配列の決定

- ヒト視床下部 cDNA (CLONTECH 社) を鋳型とし、2 個のプライマー、  
プライマー 1 : 5'- GTCGACATGG AGGGGGAGCC CTCCCAGCCT C -3' (配列番号 : 5  
5 7) およびプライマー 2 : 5'- ACTAGTTCAG ATATCCCAGG CTGGAATGG -3' (配列番号 : 5 8) を用いて P C R 反応を行った。該反応における反応液の組成は上記 cDNA を 10 分の 1 量を鋳型として使用し、 Advantage-HF Polymerase Mix (CLONTECH 社) 1/50 量、プライマー 1 (配列番号 : 5 7) およびプライマー 2 (配列番号 : 5 8) を各 0.2  $\mu$ M、dNTPs 200  $\mu$ M、Dimethyl Sulfoxide 4%、お  
10 よび酵素に添付のバッファーを加え、25  $\mu$ l の液量とした。P C R 反応は、  
① 94 $^{\circ}$ C・2 分の後、② 94 $^{\circ}$ C・20 秒、72 $^{\circ}$ C・1 分 30 秒のサイクルを 3 回、③ 94 $^{\circ}$ C・20 秒、67 $^{\circ}$ C・1 分 30 秒のサイクルを 3 回、④ 94 $^{\circ}$ C・20 秒、62 $^{\circ}$ C・20 秒、72 $^{\circ}$ C・68 $^{\circ}$ C・1 分 30 秒のサイクルを 38 回繰り返し、最後に 68 $^{\circ}$ C・7 分の伸長反応を行った。該 P C R 反応後の反応産物を T A クローニングキット (Invitrogen 社) の処  
15 方に従いプラスミドベクター pCR2.1 (Invitrogen 社) へサブクローニングした。これを大腸菌 DH5  $\alpha$  に導入し、cDNA を持つクローンをアンピシリンを含む LB 寒天培地中で選択した。個々のクローンの配列を解析した結果、新規 G 蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードする cDNA 配列 (配列番号 : 5 5 および 5 6) を得た。これら 2 種類の配列は、第 597 残基で一塩基異なるが、導き出されるアミノ酸配列は同一 (配列番号 : 5 7) であり、このアミノ酸配列を含有する新規 G 蛋白質共役型レセプター蛋白質を hOT7T022 と命名した。また 2 種類の形質転換体は大腸菌 (*Escherichia coli*) DH5  $\alpha$  / pCR2.1-hOT022T (配列番号 : 5 5 で表される cDNA を含有する)、ならびに (*Escherichia coli*) DH5  $\alpha$  / pCR2.1-hOT022G (配列番号 : 5 6 で表される cDNA を含有する) と命名した。  
25

参考例 1 2 抗ラット型 RFRP-1 モノクローナル抗体の作製

ラット型 RFRP-1 の C 末端 1 2 アミノ酸 (C 末端のカルボキシル基がアミド化されたもの : 配列番号 5 0 で表されるアミノ酸配列の第 8 3 番目 (V a l) ~ 第 9 4 番目 (P h e) のアミノ酸配列) の N 末端に Cys-残基を付加したペ

プチド(C-VPHSAANLPLRF-NH<sub>2</sub>)を抗原としたモノクローナル抗体を作製した。抗原ペプチド0.6mgをウシ血清アルブミン(BSA)にマレイイミドを用いてコンジュゲートした。このコンジュゲート100 $\mu$ gをマウスの皮下に三回注射することにより免疫した後、最終免疫としてコンジュゲート50 $\mu$ gを尾静脈に注射して免疫した。最終免疫の四日後、マウスより脾臓細胞を採取し、マウスミエローマ細胞(P3-X63Ag8-U1:Matsumoto et al, BBRC (1999) vol. 257, 264-268)とポリエチレングリコールを用いて細胞融合した。細胞融合後、ハイブリドーマ細胞、1F3を選択し、INTREGRA CL-1000を用いた大量培養にて、1F3の培養上清を得た。この培養上清より、HiTrap rProtein A column (Pharmacia)を用いて抗ラット型RFRP-1モノクローナル抗体を得た。Mouse mAb isotyping kit (Amersham)を用いて調べたところ、このモノクローナル抗体のサブタイプはIgG1  $\kappa$  chainであった。

#### 参考例 1 3 競合的EIAの構築

まず、参考例 1 2において抗原としたペプチドをマレイイミドを用いて西洋ワサビペルオキシターゼ(HRP)にコンジュゲートし、HRP-rat RFRP-1を作製した。このHRP-rat RFRP-1と参考例 1 2で得られた抗ラット型RFRP-1モノクローナル抗体を用いて競合的EIAを構築した。

抗マウスIgGAM (Cappel) 1.5 $\mu$ g/wellでコートし、Block ACE (大日本製薬)でブロッキングした96穴プレート各穴にバッファー(2mM EDTA、0.4% BSA、0.1 M NaCl、0.1% micro-O-protectを含む生理的リン酸バッファー(PBS))で希釈した抗ラット型RFRP-1モノクローナル抗体50 $\mu$ lを加え、同じバッファーに溶解したサンプル50 $\mu$ lも加えた。4 $^{\circ}$ Cにて16時間インキュベートした後、バッファーで希釈したHRP-rat RFRP-1 50 $\mu$ lを各穴に加えた。室温で2時間インキュベートした後、0.1% Tween20 (Sigma)を含むPBSでプレートを洗浄した後、各穴に結合したHRPの活性を TMB microwell peroxidase system (Kirkegaard & Perry Labs)を用いて呈色反応にて検出し450nmにおける吸光度を測定した。RFRP-1関連ペプチドをサンプルとして加えた時の吸光度の変化を図 1 1 に示す。

実施例 A 1 リガンドポリペプチドが血漿中下垂体ホルモン量に及ぼす影響

配列番号：39で表わされるペプチドの第三脳室内投与が血漿中の下垂体ホルモン量に及ぼす影響を検討した。成熟Wistar系雄性ラット（手術時体重：約290～350g）をペントバルビタール50mg/kgの腹腔内投与にて麻酔し、ラット脳定位固定装置に固定した。切歯用バーはインターオーラルラインから3.3mm低くした。頭蓋骨を露出し、ガイドカニューレを埋め込むために歯科用ドリルを用いて骨に穴を開けた。また、その周囲の一ヶ所にアンカービスを埋めた。ステンレス製ガイドカニューレ、AG-12（内径0.4mm、外径0.5mm、エイコム社）を、その先端が第三脳室の上部に位置するように挿入した。定位座標は、PaxinosとWatson（1986）のアトラスに従い、AP：+7.2mm（インターオーラルラインより）、L：0.0mm、H：+2.0mm（インターオーラルラインより）とした。ガイドカニューレは瞬間接着剤と歯科用セメントおよびアンカービスで頭蓋骨に固定した。ガイドカニューレにはステンレス製ダミーカニューレ、AD-12（外径0.35mm、エイコム社）を挿入し、キャップナット（エイコム社）で固定した。術後、ラットを個別のケージで1週間以上飼育し、術後の回復を待ってから、実験を行った。

実験を行う前日に上記手術を施したラットをペントバルビタール50mg/kgの腹腔内投与にて麻酔し、解剖用パッドの上に背位に固定した。右側の頸静脈にカテーテル（SP35, 夏目製作所）を挿入した。翌日、頸静脈カテーテルから400 $\mu$ lの血液を採取した。血液凝固を防止するため、注射筒には予め200単位/mlのヘパリンを含有する生理食塩水を20 $\mu$ l入れておいた。ラットの頭蓋骨に装着したキャップナットとダミーカニューレを取り外し、代わりにテフロンチューブ（長さ50cm、内径0.1mm、外径0.4mm、エイコム社）につなげたステンレス製マイクロインジェクションカニューレ、AMI13（内径0.17mm、外径0.35mm、エイコム社）を挿入した。マイクロインジェクションカニューレの長さは、その先端1mmがガイドカニューレから露出するように調節しておいた。テフロンチューブの一方をマイクロシリンジポンプにつなぎ、PBSまたは配列番号：39で表わされるペプチドを溶解させたPBSを5 $\mu$ l/分の流速で計10 $\mu$ lを第三脳室に注入した。注入終了後1分間待ってからマイクロインジェクションカニューレを取り外し、



再びダミーカニューレをキャップナットで固定した。脳室内投与を開始する直前、および脳室内投与の開始時点から10、20、30、40、60分後に頸静脈に挿入したカニューレより400 $\mu$ lずつ採血した。採取した血液は微量高速冷却遠心機(MR-150, トミー精工)を用いて遠心(5,000rpm、10分間)し、上清(血漿)を回収した。血漿中に含まれるプロラクチン量をラジオイムノアッセイを用いて測定した。

結果は、平均値 $\pm$ S. E. M. で表した。配列番号: 39で表わされるペプチドを溶解させたPBS投与群とPBSのみを投与した対照群との間に有意差があるか否かの検定には Student's t-testを用いた。判定は、両側検定で危険率5%以下を統計的に有意であるとした。図10に示すごとく、血漿プロラクチン量は、10nmolの配列番号: 39で表わされるペプチドを第三脳室に投与後10分から増加傾向があり、20、30、40分において有意に増加した。また、投与60分後でも対照群との間に有意な差が認められた。また、血漿中GH、LH、ACTH、TSH量は有意な変化を示さなかった。

#### 15 実施例A2 ウシ視床下部からの内因性RFRP-1の精製

参考例13で構築した競合的EIAでウシ視床下部からのペプチド粗画分にRFRP-1様免疫活性が見いだされた。このRFRP-1様免疫活性を指標に、ウシ視床下部より内因性のRFRP-1を精製した。

まず、凍結保存されたウシ視床下部2.0kgを超純水(ミリQ水)中で煮沸し、酢酸を1Mとなるように加え、ポリトロンでホモジナイズした。一晚攪拌した後、遠心にて上清を得た。上清にトリフルオロ酢酸(TFA)を0.05%となるように加え、C18カラム(Prep C18 125Å; Waters)にアプライした。カラムに結合したペプチドを0.5%TFAを含む10、30、50%アセトニトリルでステップワイズに溶出した。30%アセトニトリル画分を二倍量の20mM酢酸アンモニウム(pH4.7)で希釈し、イオン交換カラムHiPrep CM-Sepharose FF (Pharmacia)にアプライした。イオン交換カラムに結合したペプチドを10%アセトニトリルを含む20mM酢酸アンモニウム(pH4.7)中の0.1、0.2、0.5、1.0M NaClでステップワイズに溶出した。もっとも多くRFRP-1様免疫活性が含まれていた0.1M NaCl画分に3倍量の冷アセトンを加え、遠心にて沈殿を除き上清をエバポレ

- ートにて濃縮した。濃縮された上清に0.1%となるようTFAを加え、逆相HPLCカラム RESOURCE RPC (Pharmacia) にてさらなる分離を行った。RESOURCE RPCの分離は10-30%アセトニトリルの濃度勾配で行い、主たるRFRP-1様活性は、およそ22%アセトニトリルで溶出された。この活性画分を10%アセトニトリルを含む20mM酢酸アンモニウム (pH4.7) 中での0.2-0.6M NaClの濃度勾配を用いた陽イオン交換カラム TSK gel CM-SW(トソー)で分離したところ、主たるRFRP-1様活性は、およそ0.3M NaClで溶出された。RFRP-1様免疫活性を含むCM-2SWカラムの画分に0.1%となるようTFAを加え、逆相カラムdiphenyl 219TP52 (Vydac) でさらに分画した。21-25%アセトニトリルの濃度勾配で分離したところ、RFRP-1様免疫活性は23%アセトニトリルで溶出された。このRFRP-1様免疫活性を含む画分を22-23%アセトニトリルの濃度勾配を用いた逆相カラム  $\mu$ RPC C2/C18 SC2.1/10で最終精製し、RFRP-1様免疫活性と一致する単一のピークを得た(図12)。

実施例A3 最終精製標品のN末端アミノ酸配列分析およびマスペクトルによる分子量測定

- 実施例A2で得られた最終精製標品のN末端アミノ酸をプロテインシーケンサー(model 491cLC; Applied Biosystems)で分析したところ、S-L-T-F-E-E-V-K-D-X-A-P-K-I-K-M-N-K-P-V- (Xは同定できなかったアミノ酸残基を示す) で示されるアミノ酸配列が得られた。
- また、ESI-MS (Thermoquest)を用いて、最終精製標品の分子量を測定したところ、3997.0の値を得た。

これらの分析結果より、ウシ視床下部からの最終精製標品は配列番号: 14で表されるアミノ酸配列の第58番目 (Ser) から第92番目 (Phe) の35アミノ酸からなるペプチドであることが判明した。

実施例A4 配列番号: 1で表されるアミノ酸配列の第56番目 (Ser) ~ 第92番目 (Phe) のアミノ酸配列を有するペプチドのC末端のカルボキシル基がアミド化されたペプチド(以下hRFRP-1(37)と称する場合がある)の構造遺伝子の調製

配列番号: 59~62に示す4種類のDNA断片( #1: 配列番号: 15、

＃４：配列番号：１８；キコーテック社製）（＃２：配列番号：１６、＃３：配列番号：１７；アマシャム・ファルマシア・バイオテック社製）を用いて、自体公知の方法により、hRFRP-1(37)の構造遺伝子を調製した。

a) DNAオリゴマーのリン酸化

- 5        5'末端になるべき＃１及び＃４を除いた２種類のオリゴマー各１μgを100μLのリン酸化反応液〔50mM Tris-HCl (pH7.6), 10mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM スペルミジン、10mM ジチオスレイトール、0.1mg/mLウシ血清アルブミン、1mM ATP、10ユニット T4ポリヌクレオチドキナーゼ（日本ジーン）〕中で37℃、1時間反応させ、5'末端のリン酸化を行った。フェノール処理を行った後、水層を回収し2倍量のエタノールを加え、-70℃に冷却した後、遠心でDNAを沈殿させた。

b) DNAフラグメントの連結

- 15        上記a)で得られたリン酸化DNAフラグメントと＃１及び＃４各１μgを合わせ10mM Tris/HCl、2mM EDTA (pH8.0)に加え、120μLとした。この混合液を80℃で10分間保った後、室温まで徐冷しアニーリングを行った。TaKaRa DNA Ligation Kit ver.2（宝酒造）を用いてライゲーション反応を行った。アニーリング液30μLにキットに付属のII液30μLを加え良く混合した後、キットに付属のI液60μLを加え、37℃、1時間反応させ、ライゲーションを行った。フェノール処理を行った後、水層を回収し2倍量の
- 20        エタノールを加え、-70℃に冷却した後、遠心でDNAを沈殿させた。

c) 5'末端のリン酸化

- 25        沈殿をTE緩衝液（10mM Tris-HCl (pH8.0), 1mM EDTA) 10μLに溶解し、100μLのリン酸化反応液〔50mM Tris-HCl (pH7.6), 10mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM スペルミジン、10mM ジチオスレイトール、0.1mg/mLウシ血清アルブミン、1mM ATP、10ユニット T4ポリヌクレオチドキナーゼ（日本ジーン）〕中で37℃、1時間反応させ、5'末端のリン酸化を行った。フェノール処理を行った後、水層を回収し2倍量のエタノールを加え、-70℃に冷却した後、遠心でDNAを沈殿させ、20μLのTE緩衝液に溶解した。

実施例A5 hRFRP-1(37)発現プラスミドの調製

発現用ベクターとしてはpTFC（特開2000-270871号公報に記載）をNdeIおよびAvaI（宝酒造）で37℃ 4時間消化した後、1%アガロースゲル電気泳動により4.4kbのDNA断片をQIAquick Gel Extraction Kit（キアゲン社）を用いて抽出し、25μlのTE緩衝液に溶解した。このpTFCのNdeI、AvaI断片と上記により調製した

5 hRFRP-1(37)の構造遺伝子をTaKaRa DNA ligation kit ver.2（宝酒造）を用いてライゲーション反応を行った。この反応液を10μl用いて大腸菌JM109コンピテントセル（東洋紡）を形質転換し、10μg/mlのテトラサイクリンを含むLB寒天培地上に播き、37℃で1晩培養し、生じたテトラ

10 サイクリン耐性コロニーを選んだ。この形質転換体をLB培地で一晩培養し、QIAprep8 Miniprep Kit（キアゲン社）を用いてプラスミドpTFCRFRP-1を調製した。このhRFRP-1(37)構造遺伝子部分の塩基配列をアプライドバイオシステムズ社モデル377DNAシーケンサーを用いて確認した。プラスミド

15 pTFCRFRP-1で大腸菌MM294（DE3）を形質転換し、RFRP-1-CS23融合タンパク質発現株大腸菌（*Escherichia coli*）MM294(DE3)/pTFCRFRP-1を得た（図13）。

実施例A6 実施例A5で得られた形質転換体を、5.0mg/Lのテトラサイクリンを含むLB培地（1%ペプトン、0.5%酵母エキス、0.5%塩化ナトリウム）1Lを用いて、2リットル容フラスコ中で37℃、8時間

20 振とう培養した。得られた培養液を19リットルの主発酵培地（1.68%リン酸1水素ナトリウム、0.3%リン酸2水素カリウム、0.1%塩化アンモニウム、0.05%塩化ナトリウム、0.05%硫酸マグネシウム、0.02%消泡剤、0.00025%硫酸第一鉄、0.00025%塩酸チアミン、1.5%ブドウ糖、1.5%カザミノ酸）を仕込んだ50L容発酵槽へ

25 移植して、30℃で通気攪拌培養を開始した。培養液の濁度が約500クレット単位になった時点で、イソプロピルーβ-D-チオガラクトピラノシドの最終濃度が12mg/Lになるように添加し、さらに4時間培養を行った。培養終了後、培養液を遠心分離し、約500gの湿菌体を取得し、-80℃で凍結保存した。

## 実施例 A 7 hRFRP-1(37)の取得

実施例 A 6 で得た菌体 500 g に 6 M グアニジン塩酸塩、0.2 M トリス/HCL (pH 8.0) 溶液 1000 ml を加え、約 4 時間攪拌した後、遠心分離 (10000 rpm、60 分) を行い、上澄液を 0.6 M アルギニン、1  
5 mM ジチオトレイトール、50 mM トリス/HCL (pH 8.0) 29 L で希釈した。一晩 10℃ で静置した後、濃塩酸で pH 6.0 に調整し、50 mM リン酸緩衝液 (pH 6.0) で平衡化した AF-Heparin Toyopearl 650M カラム (11.3 cm ID × 13 cm L、東ソー) に通液し、吸着、洗浄した後、50 mM リン酸緩衝液、2 M NaCl、pH 6.0 で溶出を行い、1000  
10 ml の本発明のポリペプチド (hRFRP-1(37)-CS23 融合タンパク質画分を得た。

この溶出液をペリコンミニカセット (ミリポア社) で 0.1 M 酢酸を加えながら濃縮を行い、hRFRP-1(37)-CS23 融合タンパク質の 0.1 M 酢酸溶液を得た。この溶液に最終濃度 6 M となるように尿素を添加した後、1-シア  
15 アノー 4-ジメチルアミノピリジニウム塩 (DMAP-CN) 445 mg を加えて、室温で 15 分間反応した。反応終了後、反応液を 10% 酢酸で平衡化した Sephadex G-25 カラム (46 mm ID × 600 mm L、ファルマシア) に通液し、平衡化に用いた 10% 酢酸を 6 ml/min の流速で展開し、S-シアノ化された hRFRP-1(37)-CS23 融合タンパク質画分を得た。この溶出液を  
20 ペリコンミニカセット (ミリポア社) で濃縮・脱塩を行い、hRFRP-1(37)-CS23 融合タンパク質の脱塩液を得た。この脱塩液に最終濃度 6 M となるように尿素を添加した後、さらに、3 M 濃度となるように 25% アンモニア水を加え、15℃ で 15 分間反応させた。反応終了後、酢酸で pH 6.0 に調整し、hRFRP-1(37) を得た。この反応液を 3 M 尿素を含む 50 mM MES 緩  
25 衝液 (pH 4.5) で平衡化した SP-5PW (5.5 cm ID × 30 cm L、東ソー) に通液し、吸着、洗浄した後、0~50% B (B = 50 mM MES 緩衝液 + 1 M NaCl + 3 M 尿素) の段階勾配で溶出を行い、hRFRP-1(35) を得た (溶出時間: 60 分)。この hRFRP-1(37) 画分を、さらに 0.1% トリフルオロ酢酸 (TFA) で平衡化した ODS-120T (21.5 mm ID × 300 mm L、東

ソー)に通液し、吸着、洗浄した後、30～60%B (B:80%アセトニトリル/0.1%TFA)の段階勾配で溶出を行い、hRFRP-1(37)画分をプールした(溶出時間:45分)後、凍結乾燥を行い、hRFRP-1(37)凍結乾燥粉末を得た。

5 実施例A8 ヒトOT7T022受容体発現CHO細胞に対する各種RFアミドペプチドのアゴニスト活性の比較

- WO 00/29441号に記載の方法に準じた方法によって得られたヒトOT7T022受容体発現CHO細胞を $3 \times 10^5$  cells/wellの密度で24-wellプレートに播種して一晚培養した。該細胞をハンクスバッファー(HBSS)に0.05%のBSAと0.2mMのIBMX
- 10 を加えたバッファーで洗浄した後、同じバッファーで37℃、30分間のプレインキュベーションを行った。次に、ハンクスバッファー(HBSS)に0.05%のBSAと0.2mMのIBMXを加えたバッファーあるいはそれに1μMのホルスコリンのみを添加したバッファー、1μMのホルスコリンと様々な濃度のペプチドを添加したバッファーと交換し、37℃、30分間のインキュベーションを行った。イン
- 15 キュベーション終了後、各ウェルの細胞内cAMPの抽出および定量をcAMP EIA Kit (アマシャム社)の方法に従って実施した。各濃度のペプチドについて、ホルスコリン処理による細胞内cAMP量の増加を抑制した割合を算出し、図14に示すような用量-反応曲線を得た。ペプチドのED<sub>50</sub>値はそれぞれ、
- hRFRP-1-12 (配列番号:1の第81番目(Met)ないし第92番目(Phe)の
- 20 アミノ酸配列を有するペプチド(○)) (4.5nM)、hRFRP-1-37 (配列番号:1の第56番目(Ser)ないし第92番目(Phe)のアミノ酸配列を有するペプチド(■)) (21nM)、rRFRP-1-37 (配列番号:50の第58番目(Ser)ないし第94番目(Phe)のアミノ酸配列を有するペプチド(◇)) (30nM)、
- hRFRP-2-12 (配列番号:1の第101番目(Phe)ないし第112番目(Ser)
- 25 のアミノ酸配列を有するペプチド(▲))、hRFRP-3-8 (配列番号:1の第124番目(Val)ないし第131番目(Phe)のアミノ酸配列を有するペプチド(□)) (9.9nM)、PQRFamide (Pro-Gln-Arg-Phe-NH<sub>2</sub>で表されるペプチド(◆)) (1000nM以上)、LPLRFamide (Leu-Pro-Leu-Arg-Phe-NH<sub>2</sub>で表されるペプチド(●)) (36nM)、NPFF (Asn-Pro-Phe-Pheで表されるペプチド(△))

(140nM) であった。

#### 実施例 A 9 RFRPペプチドによるヒトOT7T022受容体の活性化に対する百日咳毒素の効果の検討

- 実施例 A 8 で取得したヒトOT7T022受容体発現CHO細胞を  $1 \times 10^5$  cells/well
- 5 の密度で24-wellプレートに播種して一晚培養した後、100ng/mlの百日咳毒素 (pertussis toxin, SIGMA社) を添加した培地あるいはコントロールの培地に交換し、さらに一晚培養した。細胞をハンスバッファー (HBSS) に0.05%のBSAと0.2mMのIBMXを加えたバッファーで洗浄した後、同じバッファーで37℃、30分間のプレインキュベーションを行った。次に、細胞をハンスバッファー
- 10 (HBSS) に0.05%のBSAと0.2mMのIBMXを加えたバッファーのみ(黒色のカラム)、あるいはそれに  $1 \mu\text{M}$  のホルスコリンのみを添加したバッファー(白色のカラム)、 $1 \mu\text{M}$  のホルスコリンと  $0.1 \mu\text{M}$  のRFRP-1-12 (配列番号: 1の第81番目 (Met) ないし第92番目 (Phe) のアミノ酸配列を有するペプチド) を添加したバッファー(斜線のカラム) と交換し、37℃、30分間のインキュベ
- 15 ションを行った。インキュベーション終了後、各ウェルの細胞内cAMPの抽出および定量をcAMP EIA Kit (アマシャム社) の方法に従って実施した。その結果、図15に示すように百日咳毒素で処理した細胞についてはRFRP-1-12によるcAMP産生抑制活性が消失したことから、OT7T022受容体を介したcAMP産生抑制反応は百日咳毒素感受性のGタンパク質  $\alpha$  サブユニットであるGi (抑制
- 20 性) あるいはGoに共役していることが示された。

#### 実施例 B 1 抗ラット型RFRP-3モノクローナル抗体の作製

- ラット型RFRP-3のC末端8アミノ酸(C末端アミド化)のN末端にCys一残基を付加したペプチド(C-FPSLPQRF-NH<sub>2</sub>)を抗原としたモノクローナル抗体を作製した。抗原ペプチド0.6mgをウシ血清アルブミン(BSA)にマレイイミドを用
- 25 いてコンジュゲートした。このコンジュゲート100  $\mu\text{g}$  をマウスの皮下に三回免疫した後、最終免疫としてコンジュゲート50  $\mu\text{g}$  を尾静脈に免疫した。最終免疫の四日後、マウスより脾臓細胞を採取し、マウスミエローマ細胞 (P3-X63Ag8-U1) とポリエチレングリコールを用い細胞融合した。細胞融合後、ハイブリドーマ細胞、7F6を選択し、INTREGRA CL-1000を用いた大量培養にて、

7 F6の培養上清を得た。この培養上清より、HiTrap rProtein A column (Pharmacia) を用いて抗ラット型RFRP-3モノクローナル抗体を得た。Mouse mAb isotyping kit (Amersham)を用いて調べたところ、このモノクローナル抗体のサブタイプはIgG2b  $\kappa$  chainであった。

#### 5 実施例 B 2 競合的EIAの構築

まず、抗原としたペプチドをマレイイミドを用いて西洋ワサビペルオキシターゼ (HRP) にコンジュゲートし、HRP-rat RFRP-3を作製した。このHRP-rat RFRP-3と実施例 B 1 で得られた抗ラット型RFRP-3モノクローナル抗体を用いて競合的EIAを構築した。

- 10 抗マウスIgGAM (Cappel) 1.5  $\mu$ g/wellでコートし、Block ACE (大日本製薬) でブロッキングした96穴プレート各穴にバッファー(2mM EDTA、0.4% BSA、0.1 M NaCl、0.1% micro-0-protectを含む生理的リン酸バッファー(PBS))で希釈した抗ラット型RFRP-3モノクローナル抗体50  $\mu$ lを加え、同じバッファーに溶解したサンプル50  $\mu$ lも加えた。4℃にて16時間インキュベートした後、バッ
- 15 ファーで希釈したHRP-rat RFRP-3 50  $\mu$ lを各穴に加えた。室温で2時間インキュベートした後、0.1% Tween20 (Sigma)を含むPBSでプレートを洗浄した後、各穴に結合したHRPの活性を TMB microwell peroxidase systemを用いて呈色反応にて検出し450nmにおける吸光度を測定した。RFRP-3関連ペプチドをサンプルとして加えた時の吸光度の変化を図16に示す。

#### 20 実施例 B 3 ウシ視床下部からの内因性RFRP-3の精製

実施例 B 2 で構築した競合的EIAでウシ視床下部からのペプチド粗画分にRFRP-3様免疫活性が見いだされた。このRFRP-3様免疫活性を指標に、ウシ視床下部より内因性のRFRP-3を精製した。

- まず、凍結保存されたウシ視床下部2.0kg をミリQ水中で煮沸し、酢酸を
- 25 1Mとなるように加え、ポリトロンでホモジナイズした。一晚攪拌した後、遠心にて上清を得た。上清にトリフルオロ酢酸(TFA)を0.05%となるように加え、C18カラム (Prep C18 125Å; Waters) にアプライした。カラムに結合したペプチドを0.5%TFAを含む10、30、50%アセトニトリルでステップワイズに溶出した。30%アセトニトリル画分を二倍量の20mM酢酸アンモニウム (pH4.7) で希釈



し、イオン交換カラム HiPrep CM-Sepharose FF (Pharmacia) にアブライした。イオン交換カラムに結合したペプチド10%アセトニトリルを含む20mM酢酸アンモニウム (pH4.7) 中の0.1、0.2、0.5、1.0M NaClでステップワイズに溶出した。もっとも多くRFRP-3様免疫活性が含まれていた0.2M NaCl画分に3倍量の冷アセトンを加え、遠心にて沈殿を除き上清をエバポレートにて濃縮した。濃縮された上清に0.1%となるようTFAを加え、逆相HPLCカラム RESOURCE RPC (Pharmacia) にてさらなる分離を行った。RESOURCE RPCの分離は10~30%アセトニトリルの濃度勾配で行い、主たるRFRP-3様活性は、およそ23%アセトニトリルで溶出された。この活性画分を10%アセトニトリルを含む20mM酢酸アンモニウム (pH4.7) 中での0.2~0.6M NaClの濃度勾配を用いた陽イオン交換カラム TSK gel CM-SW(トーソー) で分離したところ、主たるRFRP-3様活性は、およそ0.36M NaClで溶出された。RFRP-3様免疫活性を含むCM-2SWカラムの画分に0.1%となるようTFAを加え、18-23%アセトニトリルの濃度勾配を用いた逆相カラム  $\mu$ RPC C2/C18 SC2.1/10で最終精製し、RFRP-3様免疫活性と一致するピークを得た(図17)。

実施例B4 最終精製標品のN末端アミノ酸配列分析およびマスペクトルによる分子量測定

実施例B3で得られた最終精製標品のN末端アミノ酸をプロテインシーケンサー(491cLC; Applied Biosystems)で分析したところ、図18に示すアミノ酸配列が得られた。

また、ESI-MS (LCQ; Thermoquest)を用いて、最終精製標品の分子量を測定したところ、3302の値を得た(図19)。5価の分子関連イオン( $m/z$  661)をブリカーサーイオンとして測定したMS/MSスペクトルは、RFRP前駆体Ala104から始まる28残基のペプチドの構造に帰属された(図20)。これらの分析結果より、ウシ視床下部からの最終精製標品はウシRFRP前駆体のAla104からPhe131までに相当する28アミノ酸からなるペプチドであることが判明した。

実施例B5 抗ラット型RFRP-3ポリクローナル抗体の作製

ラット型RFRP-3の17アミノ酸のC末端にCys-残基を付加したペプチド(NMEAGTMSGFPSLPQRF-Cys)を抗原としたポリクローナル抗体を作製した。抗原

- ペプチド0.6mgをウシ血清アルブミン(BSA)にマレイイミドを用いてコンジュゲートした。このコンジュゲート500 $\mu$ gをウサギの皮下に四回免疫して後、採血し、抗血清を得た。抗血清10mlに2倍量の3M硫酸を加え、IgG画分を調整し、抗原カラム(抗原を結合させたSulfo-linkカラム(PIERCE))にてアフィニティー精製した結合分画を、抗ラット型RFRP-3ポリクローナル抗体として得た。

#### 実施例B 6 競合的EIAの構築

- まず、抗原としたペプチドをマレイイミドを用いて西洋ワサビペルオキシターゼ(HRP)にコンジュゲートし、HRP-rat RFRP-3(N)を作製した。このHRP-rat RFRP-3(N)と実施例5Bで得られた抗ラット型RFRP-3ポリクローナル抗体を用いて競合的EIAを構築した。

- 抗ウサギIgG(Cappel) 1.5 $\mu$ g/wellでコートし、Block ACE(大日本製薬)でブロッキングした96穴プレート各穴にバッファー(2mM EDTA、0.4% BSA、0.1M NaCl、0.1% micro-O-protectを含む生理的リン酸バッファー(PBS))で希釈した抗ラット型RFRP-3ポリクローナル抗体50 $\mu$ lを加え、同じバッファーに溶解したサンプル50 $\mu$ lも加えた。4℃にて16時間インキュベートした後、バッファーで希釈したHRP-rat RFRP-3(N) 50 $\mu$ lを各穴に加えた。室温で2時間インキュベートした後、0.1% Tween20(Sigma)を含むPBSでプレートを洗浄した後、各穴に結合したHRPの活性をTMB microwell peroxidase systemを用いて呈色反応にて検出し450nmにおける吸光度を測定した。RFRP-3関連ペプチドをサンプルとして加えた時の吸光度の変化を図21に示す。

#### 実施例B 7 ヒト型RFRP-3(28)の製造

Ala-Thr-Ala-Asn-Leu-Pro-Leu-Arg-Ser-Gly-Arg-Asn-Met-Glu-Val-Ser-Leu-Val-Arg-Arg-Val-Pro-Asn-Leu-Pro-Gln-Arg-Phe-NH<sub>2</sub> (配列番号: 63)

- 市販p-メチルBHA樹脂(アプライド バイオシテムズ社製) 0.5 mmole分をペプチド合成機(アプライド バイオシテムズ社製430A)の反応器に入れ、DCMで膨潤させた後、最初のアミノ酸Boc-PheをHOBt/DCC法で活性化しp-メチルBHA樹脂に導入した。樹脂を50%TFA/DCMで処理し、Boc基を除去してアミノ基を遊離させ、DIEAで中和した。このアミノ基に次のアミ

ノ酸 Boc-Arg(Tos) を HOBt/DCC 法で縮合した。未反応アミノ基の有無をニンヒドリンテストで調べ、未反応アミノ基が残存したときには再度縮合を繰り返し反応完了を確認後同様に、Boc-Gln、Boc-Pro、Boc-Leu、Boc-Asn、Boc-Val、Boc-Arg(Tos)、Boc-Ser(Bzl)、Boc-Glu(OcHex)、Boc-Met、Boc-Asn、Boc-Gly、  
 5 Boc-Thr(Bzl)、をヒト型 RFRP-3(28)の配列順に縮合し、  
 Boc-Ala-Thr(Bzl)-Ala-Asn-Leu-Pro-Leu-Arg(Tos)-Ser(Bzl)-Gly-Arg(Tos)-Asn-Met-Glu(OcHex)-Val-Ser(Bzl)-Leu-Val-Arg(Tos)-Arg(Tos)-Val-Pro-Asn-Leu-Pro-Gln-Arg(Tos)-Phe-pMBHA樹脂を得た。

この樹脂0.3gをp-クレゾール3.1g、弗化水素15mlと共にテフロン製弗化  
 10 水素反応装置中で0℃・60分間反応した。弗化水素を減圧留去し、残留物にジエチルエーテル100mlを加え攪拌後、グラスフィルター上に濾取、乾燥した。これを50%酢酸水溶液50ml中に懸濁、攪拌し、ペプチドを抽出した後樹脂と分離し減圧下に約5mlまでに濃縮した後、セファデックスG-25(2x90cm)のカラムに付し50%酢酸水で展開し主要画分を集め凍結乾燥した。次にこの粗ペプ  
 15 チドを5%チオグリコール酸/50%酢酸1.5mlに溶解し、50℃12時間保持しMet酸化体ペプチドを還元した後、LiChroprep(登録商標)RP-18(MERCK社製)を充填した逆相系カラムにつけ0.1%TFA水と0.1%TFA含有33%アセトニトリル水溶液を用いたグラジエント溶出での精製をくり返し、主要画分を集め凍結乾燥し、白色粉末30mgを得た。

20 質量分析による (M+H)<sup>+</sup> 3190.9

HPLC溶出時間 15.5分

カラム条件

カラム: Wakosil II5C18HG (4.6x100mm)

溶離液: A液 (0.1% TFA含有5%アセトニトリル水)

25 B液 (0.1% TFA含有55%アセトニトリル水) を用い

A液からB液へ直線型濃度勾配溶出 (25分)

流速: 1.0 ml/分

実施例B8 ヒト型 RFRP-3(31)の製造

Ser-Ala-Gly-Ala-Thr-Ala-Asn-Leu-Pro-Leu-Arg-Ser-Gly-Arg-Asn-Met-Glu-Va

1-Ser-Leu-Val-Arg-Arg-Val-Pro-Asn-Leu-Pro-Gln-Arg-Phe-NH<sub>2</sub> (配列番号 : 65)

実施例 B 7 で調製した

Boc-Ala-Thr(Bzl)-Ala-Asn-Leu-Pro-Leu-Arg(Tos)-Ser(Bzl)-Gly-Arg(Tos)-Asn-Met-Glu(OcHex)-Val-Ser(Bzl)-Leu-Val-Arg(Tos)-Arg(Tos)-Val-Pro-Asn-Leu-Pro-Gln-Arg(Tos)-Phe-pMBHA樹脂にさらに Boc-Gly, Boc-Ala, Boc-Ser(Bzl)を同様に順次縮合し、  
Boc-Ser(Bzl)-Ala-Gly-Ala-Thr(Bzl)-Ala-Asn-Leu-Pro-Leu-Arg(Tos)-Ser(Bzl)-Gly-Arg(Tos)-Asn-Met-Glu(OcHex)-Val-Ser(Bzl)-Leu-Val-Arg(Tos)-Arg(Tos)-Val-Pro-Asn-Leu-Pro-Gln-Arg(Tos)-Phe-pMBHA樹脂を得た。

この樹脂を実施例 B 7 と同様に弗化水素反応処理して得た粗ペプチドを同様に精製し、白色粉末 25 mg を得た。

質量分析による (M+H)<sup>+</sup> 3405.9

HPLC 溶出時間 15.7 分

15 カラム条件

カラム : Wakosil II 5 C 18 HG (4.6 x 100 mm)

溶離液 : A 液 (0.1% TFA 含有 5% アセトニトリル水)

B 液 (0.1% TFA 含有 55% アセトニトリル水) を用い

A 液から B 液へ直線型濃度勾配溶出 (25 分)

20 流速 : 1.0 ml / 分

実施例 B 9 Leu-Pro-Gln-Arg-Phe-NH<sub>2</sub> (配列番号 : 69) : hRFRP-3(5) の製造

実施例 B 7 の樹脂を調製途中 Boc-Leu-Pro-Gln-Arg(Tos)-Phe-pMBHA樹脂を一部取り出し、これを実施例 B 7、B 8 と同様に弗化水素処理しセファデックス G-25 (2 x 90 cm) のカラムで精製、さらに LiChroprep (登録商標)

25 RP-18 (MERCK 社製) を充填した逆相系カラムで精製し

Leu-Pro-Gln-Arg-Phe-NH<sub>2</sub> を得る。

実施例 B 10 Asn-Leu-Pro-Gln-Arg-Phe-NH<sub>2</sub> (配列番号 : 70) : hRFRP-3(6) の製造

実施例 B 7 の樹脂を調製途中 Boc-Asn-Leu-Pro-Gln-Arg(Tos)-Phe-pMBH

A樹脂を一部取り出し、これを実施例B 7、B 8と同様に弗化水素処理しセファデックス G-25 (2 x 90 cm) のカラムで精製、さらに LiChroprep (登録商標) RP-18 (MERCK社製) を充填した逆相系カラムで精製し

Asn-Leu-Pro-Gln-Arg-Phe-NH<sub>2</sub>を得る。

- 5 実施例 B 1 1 Pro-Asn-Leu-Pro-Gln-Arg-Phe-NH<sub>2</sub> (配列番号: 7 1): hRFRP-3 (7) の製造

実施例 B 7 の樹脂を調製途中 Boc-Pro-Asn-Leu-Pro-Gln-Arg (Tos)-Phe-p M BHA樹脂を一部取り出し、これを実施例 B 7、B 8と同様に弗化水素処理しセファデックス G-25 (2 x 90 cm) のカラムで精製、さらに LiChroprep (登録商標) RP-18 (MERCK社製) を充填した逆相系カラムで精製し  
10 Pro-Asn-Leu-Pro-Gln-Arg-Phe-NH<sub>2</sub>を得る。

実施例 B 1 2 <sup>125</sup>I 標識 hRFRP-3 (8) の作成

- Tyr-hRFRP-3 (8) (0.1mM) 20 μl、蒸留水 10 μl、ラクトペルオキシダーゼ (シグマ社、10 μg/mL に 0.1M HEPES-NaOH pH7.0 を用いて調製) 20 μl、Idoine-125  
15 (アマシャム社製、IMS-30、74MBq) 10 μl、0.005% 過酸化水素 (和光純薬社製) 20 μl を混合、室温で 10 分静置した後、0.1% TFA 600 μl を添加して逆相 HPLC にて分離、標識体のピークを分取した。直ちに氷上に保管し、等量のアッセイ  
20 用バッファー (50mM Tris-HCl, pH7.5、5mM EDTA、0.1% ウシ血清アルブミン (シグマ社製)、0.5mM PMSF (和光純薬社製)、20 μg/mL leupeptin (ペプチド研究所製)、0.1 μg/mL pepstatinA (ペプチド研究所製)、4 μg/mL E-64 (ペプチド研究所製)、10mM MgCl<sub>2</sub>) を加えたのち、一部を採取して γ-カウンターで放射活性を測定し、残りの標品は 100 μl ずつ分注して凍結保存した。

実施例 B 1 3 ヒト型 OT7T022 発現 CHO 細胞膜画分の調製

- ヒト型 OT7T022 発現 CHO 細胞を培養したフラスコを 5mM EDTA/PBS で洗浄、5mM  
25 EDTA/PBS で細胞を剥がし、遠心して細胞を回収、25mL の膜画分調製用緩バッファー (50mM Tris-HCl, pH7.5、5mM EDTA、0.1% ウシ血清アルブミン (シグマ社製)、0.5mM PMSF (和光純薬社製)、20 μg/mL leupeptin (ペプチド研究所製)、0.1 μg/mL pepstatinA (ペプチド研究所製)、4 μg/mL E-64 (ペプチド研究所製)) に懸濁、ポリトロンを用い氷上でホモジナイズした (12,000rpm、

- 15 秒×3 回)。これを、高速冷却遠心機にて 4℃、1,000g、10 分遠心し、上清を回収した。沈殿に 25mL の膜面分調製用緩衝バッファーを加え、同様の操作で上清を回収した。これら上清をまとめ、セルストレーナーにかけた後、超遠心機用チューブに分注し、4℃、100,000g、1 時間遠心した。ペレットを回収し、
- 5 少量の膜面分調製用バッファーに懸濁し、テフロンホモジナイザーを用いて懸濁した後、一部を用いて蛋白量を測定し、残りを分注して-80℃にて保存した。

#### 実施例 B 1 4 結合阻害試験

- アッセイ用バッファー (50mM Tris-HCl, pH7.5、5mM EDTA、0.1% ウシ血清アルブミン(シグマ社製)、0.5mM PMSF(和光純薬社製)、20  $\mu$ g/mL leupeptin(ペ
- 10 プチド研究所製)、0.1  $\mu$ g/mL pepstatinA (ペプチド研究所製)、4  $\mu$ g/mL E-64 (ペプチド研究所製)、10mM  $MgCl_2$ ) を作成した。これを用いて、ヒト型 OT7T022 発現 CHO 細胞の膜面分を 1  $\mu$ g/25  $\mu$ l となるよう希釈した。表 1 に示したペプチドは、 $10^{-2}M$  又は  $10^{-3}M$  のストック溶液を、アッセイの濃度 ( $10^{-5}M$ 、 $10^{-6}M$ 、 $10^{-7}M$ 、 $10^{-8}M$ 、 $10^{-9}M$ 、 $10^{-10}M$ 、 $10^{-11}M$ ) の 2 倍濃度となるようアッセイ用バッファーで希釈
- 15 した。非特異的結合の測定として、20  $\mu$ M Tyr-hRFRP-3(8)を調製した。調製した試料溶液、NSB、トータルとしてアッセイバッファーを、ポリプロピレン製 96 穴プレートに、4 連で 50  $\mu$ l 分注した。標識ペプチドは、調製した  $^{125}I$ -Tyr-hRFRP-3(8)を測定用緩衝液で 400pM に希釈、25  $\mu$ l を分注し、プレートミキサーで攪拌した。そこにヒト型 OT7T022 発現 CHO 細胞膜面分溶液 25  $\mu$ l を
- 20 分注し、プレートミキサーで攪拌、室温 1 時間半インキュベートした。これを、96 穴プレート用セルハーベスターを用いて、洗浄用バッファー (50mM Tris-HCl, pH7.5) で予め湿らせたフィルターユニット (GF/C、ポリエチレンイミン処理) に吸着、5 回洗浄用緩衝液で洗浄した後、十分に乾燥させた。フィルターユニットの下部をシール、液体シンチレーターを 50  $\mu$ l 分注した後上部をシールし、ト
- 25 ップカウント (パッカー社) で放射活性を測定し、3 連でデータを解析した。表 1 に  $IC_{50}$  値を示す。

#### 実施例 B 1 5 cAMP 産生抑制試験

ヒト型 OT7T022 を発現させた CHO 細胞を、24 穴プレートに  $3 \times 10^5$  個/well で継代し、37℃、5%CO<sub>2</sub> 95%air で一日培養した。アッセイ用バッファーとして、

- Hanks' Balanced Salt Solution (ギブコ社製) に、0.05% ウシ血清アルブミン (BSA、シグマ社製)、200  $\mu$ M 3-isobutyl-1-methylxanthine(シグマ社製)を加えたものを調製した。一晚培養したプレートは、まず、アッセイ用バッファ
- 5 ー400  $\mu$ l で二回洗浄後、アッセイ用バッファー400  $\mu$ l に交換して、30分、37°C、100% air で培養した。試料希釈用バッファーとしてアッセイ用バッファーに1  $\mu$ M フォルスコリンを添加したものを作成、これを用い表1に示したペプチドのストック溶液( $10^{-2}$ M 又は  $10^{-3}$ M)を希釈して、 $10^{-6}$ M、 $10^{-7}$ M、 $10^{-8}$ M、 $10^{-9}$ M、 $10^{-10}$ Mの試料溶液を調製した。アッセイ用バッファーで30分培養したプレートを取り
- 10 出し、アッセイ用バッファーで一回洗浄後、試料溶液 500  $\mu$ l を添加した。一つの試料につき、測定は3連で行った。また、basal level 測定用に同量のアッセイ用バッファー、maximum level 測定用に同量の試料希釈用バッファーを添加した。プレートを、30分、37°C、100% air で培養し、細胞内 cAMP 量を、Biotrak™
- 15 cAMP enzymeimmunoassay (EIA) system(アマシャム ファルマシア バイオテック社製)を用い、本キットのプロトコールに従い測定した。Maximum level の cAMP 量と各サンプルを添加した時の cAMP 量の差を算出して、フォルスコリンによる cAMP 産生促進量に対する百分率を算出し、これを cAMP の産生の抑制率とした。表1に各試料の  $EC_{50}$  値を示す。

[表1]

20		結合阻害	cAMP産生阻害
		IC <sub>50</sub> (nM)	EC <sub>50</sub> (nM)
	hRFRP-3 (31)	1.3	4.8
	hRFRP-3 (28)	1.1	5.1
	hRFRP-3 (8)	1.2	4.1
25	hRFRP-3 (7)	0.62	3.2
	hRFRP-3 (6)	2.6	3.7
	hRFRP-3 (5)	2.1	3.8
	hRFRP-3 (28)	1.6	4.1

#### 産業上の利用可能性

本発明のRFRP-3は、プロラクチン分泌の促進および抑制作用を有する。すなわち、本発明のRFRP-3はプロラクチン分泌の促進作用を有するため、プロラクチン分泌不全に関係する各種疾患の予防および治療薬に用5 いることができる。一方、本発明のRFRP-3は、そのレセプター蛋白質との親和性が強いため、投与量が増えるとプロラクチン分泌に対し脱感作（desensitization）が起こる結果、プロラクチン分泌を抑制する作用も有する。この場合、プロラクチン過剰分泌に関係する各種疾患の予防および治療薬に用いることができる。



## 請求の範囲

1. (1) 配列番号：1の第104番目 (Ala) ないし第131番目 (Phe) のアミノ酸配列からなるペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステル  
5 またはその塩、(2) 配列番号：1の第101番目 (Ser) ないし第131番目 (Phe) のアミノ酸配列からなるペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩または (3) 配列番号：14の第104番目 (Ala) ないし第131番目 (Phe) のアミノ酸配列からなるペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩。
- 10 2. (1) 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列の第125番目 (Pro) ないし第131番目 (Phe) のアミノ酸配列からなるペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、(2) 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列の第126番目 (Asn) ないし第131番目 (Phe) のアミノ酸配列からなるペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩  
15 または (3) 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列の第127番目 (Leu) ないし第131番目 (Phe) のアミノ酸配列からなるペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩。
3. 請求項1または2記載のペプチドのアミドまたはその塩。
4. C末端のカルボキシル基がアミド化されている請求項1または2記載の  
20 ペプチドまたはその塩。
5. 請求項1記載のペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド。
6. 請求項2記載のペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド。
- 25 7. DNAである請求項5または6記載のポリヌクレオチド。
8. (1) 配列番号：2の第310番目ないし第393番目の塩基配列、(2) 配列番号：2の第301番目ないし第393番目の塩基配列、または (3) 配列番号：15の第310番目ないし第393番目の塩基配列からなる請求項5記載のポリヌクレオチド。

9. (1) 配列番号：2の第373番目ないし第393番目の塩基配列、(2) 配列番号：2の第376番目ないし第393番目の塩基配列、または(3) 配列番号：2の第379番目ないし第393番目の塩基配列からなる請求項6記載のポリヌクレオチド。
- 5 10. 請求項5または6記載のポリヌクレオチドを含有する組換えベクター。  
11. 請求項10記載の組換えベクターで形質転換させた形質転換体。  
12. 請求項11記載の形質転換体を培養し、請求項1または2記載のペプチドを生成せしめることを特徴とする請求項1または2記載のペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の製造法。
- 10 13. 請求項1または2記載のペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有してなる医薬。  
14. 請求項5または6記載のポリヌクレオチドを含有してなる医薬。  
15. プロラクチン分泌調節剤である請求項13または14記載の医薬。  
16. プロラクチン分泌促進剤である請求項13または14記載の医薬。
- 15 17. プロラクチン分泌抑制剤である請求項13または14記載の医薬。  
18. 卵巣機能低下症、精囊發育不全、骨粗鬆症、更年期障害、乳汁分泌不全、甲状腺機能低下または腎不全の予防・治療薬である請求項16記載の医薬。  
19. 高プロラクチン血症、下垂体腺腫瘍、間脳腫瘍、月経異常、ストレス、自己免疫疾患、プロラクチノーマ、不妊症、インポテンス、無月経症、乳汁漏症、末端肥大症、キアリ・フロンメル (Chiari-Frommel) 症候群、アルゴンツ-デル・カスティロ (Argonz-del Castilo) 症候群、フォーベス・アルブライト (Forbes-Albright) 症候群、乳癌リンパ腫、シーハン症候群または精子形成異常の予防・治療剤である請求項17記載の医薬。
- 20 20. 哺乳動物の乳汁の分泌促進剤である請求項13または14記載の医薬。  
21. プロラクチン分泌機能の検査薬である請求項13または14記載の医薬。  
22. 請求項1または2記載のペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩に対する抗体。
- 25

23. 請求項22記載の抗体を含有してなる医薬。

24. 高プロラクチン血症、下垂体腺腫瘍、間脳腫瘍、月経異常、ストレス、自己免疫疾患、プロラクチノーマ、不妊症、インポテンス、無月経症、乳汁漏症、末端肥大症、キアリ・フロンメル (Chiari-Frommel) 症候群、アルゴンツ-デル・カスティロ (Argonz-del Castilo) 症候群、フォーベス・アルブライト (Forbes-Albright) 症候群、乳癌リンパ腫またはシーハン症候群または精子形成異常の予防・治療剤である請求項23記載の医薬。

25. 請求項22記載の抗体を含有してなる診断剤。

26. 卵巣機能低下症、精嚢發育不全、骨粗鬆症、更年期障害、乳汁分泌不全、甲状腺機能低下または腎不全、高プロラクチン血症、下垂体腺腫瘍、間脳腫瘍、月経異常、ストレス、自己免疫疾患、プロラクチノーマ、不妊症、インポテンス、無月経症、乳汁漏症、末端肥大症、キアリ・フロンメル (Chiari-Frommel) 症候群、アルゴンツ-デル・カスティロ (Argonz-del Castilo) 症候群、フォーベス・アルブライト (Forbes-Albright) 症候群、乳癌リンパ腫またはシーハン症候群または精子形成異常の診断剤である請求項25記載の診断剤。

27. 請求項5または6記載のポリヌクレオチドを含有してなる診断剤。

28. 卵巣機能低下症、精嚢發育不全、骨粗鬆症、更年期障害、乳汁分泌不全、甲状腺機能低下または腎不全、高プロラクチン血症、下垂体腺腫瘍、間脳腫瘍、月経異常、ストレス、自己免疫疾患、プロラクチノーマ、不妊症、インポテンス、無月経症、乳汁漏症、末端肥大症、キアリ・フロンメル (Chiari-Frommel) 症候群、アルゴンツ-デル・カスティロ (Argonz-del Castilo) 症候群、フォーベス・アルブライト (Forbes-Albright) 症候群、乳癌リンパ腫またはシーハン症候群または精子形成異常の診断剤である請求項27記載の診断剤。

29. 請求項1または2記載のペプチドをコードするDNAに相補的または実質的に相補的な塩基配列またはその一部を有し、該DNAの発現を抑制し得る作用を有するアンチセンスDNA。

30. 請求項29記載のアンチセンスDNAを含有してなる医薬。

- 3 1. 高プロラクチン血症、下垂体腺腫瘍、間脳腫瘍、月経異常、ストレス、自己免疫疾患、プロラクチノーマ、不妊症、インポテンス、無月経症、乳汁漏症、末端肥大症、キアリ・フロネル (Chiari-Frommel) 症候群、アルゴンツ-デル・カスティロ (Argonz-del Castillo) 症候群、フォーベス・アルブライト (Forbes-Albright) 症候群、乳癌リンパ腫またはシーハン症候群または精子形成異常の予防・治療剤である請求項 3 0 記載の医薬。
- 5 3 2. 請求項 1 または 2 記載のペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を用いることを特徴とする請求項 1 または 2 記載のペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法。
- 10 3 3. さらに配列番号：3 7 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質またはその塩、またはその部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を用いることを特徴とする請求項 3 2 記載のスクリーニング方法。
- 15 3 4. さらに配列番号：3 7 または配列番号：5 4 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質またはその塩、またはその部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を用いることを特徴とする請求項 3 2 記載のスクリーニング方法。
- 20 3 5. 請求項 1 または 2 記載のペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有してなる請求項 1 または 2 記載のペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット。
- 25 3 6. 請求項 3 2 記載のスクリーニング方法または請求項 3 5 記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、請求項 1 または 2 記載のペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩。
- 3 7. 請求項 1 または 2 記載のペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩を含有してなる医薬。

38. 請求項1または2記載のペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を促進する化合物またはその塩を含有してなるプロラクチン分泌促進剤。

39. 請求項1記載のペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を促進する化合物またはその塩を含有してなる卵巣機能低下症、精囊發育不全、骨粗鬆症、更年期障害、乳汁分泌不全、甲状腺機能低下または腎不全の予防・治療剤。

40. 請求項1または2記載のペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を促進する化合物またはその塩を含有してなる哺乳動物の乳汁の分泌促進剤。

41. 請求項1または2記載のペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を阻害する化合物またはその塩を含有してなるプロラクチン分泌抑制剤。

42. 請求項1または2記載のペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を阻害する化合物またはその塩を含有してなる高プロラクチン血症、下垂体腺腫瘍、間脳腫瘍、月経異常、ストレス、自己免疫疾患、プロラクチノーマ、不妊症、インポテンス、無月経症、乳汁漏症、末端肥大症、キアリ・フロンメル (Chiari-Frommel) 症候群、アルゴンツ・デル・カスティロ (Argonz-del Castillo) 症候群、フォーベス・アルブライト (Forbes-Albright) 症候群、乳癌リンパ腫、シーハン症候群または精子形成異常の予防・治療剤。

43. 哺乳動物に対して、①請求項1または2記載のペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、②請求項5または6記載のポリヌクレオチドまたは③請求項1または2記載のペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を促進する化合物またはその塩の有効量を投与することを特徴とするプロラクチン分泌促進方法。

44. 哺乳動物に対して、①請求項1または2記載のペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、②請求項5または6記載のポリヌクレオチドまたは③請求項1または2記載のペプチドもしくはそのアミド

もしくはそのエステルまたはその塩の活性を促進する化合物またはその塩の有効量を投与することを特徴とする卵巣機能低下症、精嚢発育不全、骨粗鬆症、更年期障害、乳汁分泌不全、甲状腺機能低下または腎不全の予防・治療方法。

5     4 5. 哺乳動物に対して、①請求項 2 2 記載の抗体、②請求項 2 9 記載のアンチセンスDNAまたは③請求項 1 または 2 記載のペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を阻害する化合物またはその塩の有効量を投与することを特徴とするプロラクチン分泌抑制方法。

4 6. 哺乳動物に対して、①請求項 2 2 記載の抗体、②請求項 2 9 記載のアンチセンスDNAまたは③請求項 1 または 2 記載のペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を阻害する化合物またはその塩の有効量を投与することを特徴とする高プロラクチン血症、下垂体腺腫瘍、間脳腫瘍、月経異常、ストレス、自己免疫疾患、プロラクチノーマ、不妊症、インポテンス、無月経症、乳汁漏症、末端肥大症、キアリ・フロンメル

15     (Chiari-Frommel) 症候群、アルゴンツ-デル・カスティロ (Argonz-del Castilo) 症候群、フォーベス・アルブライト (Forbes-Albright) 症候群、乳癌リンパ腫、シーハン症候群または精子形成異常の予防・治療方法。

4 7. プロラクチン分泌促進剤を製造するための①請求項 1 または 2 記載のペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、②請求項 20     5 または 6 記載のポリヌクレオチドまたは③請求項 1 または 2 記載のペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を促進する化合物またはその塩の使用。

4 8. 卵巣機能低下症、精嚢発育不全、骨粗鬆症、更年期障害、乳汁分泌不全、甲状腺機能低下または腎不全の予防・治療剤を製造するための①請求項 25     1 または 2 記載のペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、②請求項 5 または 6 記載のポリヌクレオチドまたは③請求項 1 または 2 記載のペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を促進する化合物またはその塩の使用。

4 9. プロラクチン分泌阻害剤を製造するための①請求項 2 2 記載の抗体、

②請求項 2 9 記載のアンチセンス DNA または③請求項 1 または 2 記載のペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を阻害する化合物またはその塩の使用。

- 5 50. 高プロラクチン血症、下垂体腺腫瘍、間脳腫瘍、月経異常、ストレス、自己免疫疾患、プロラクチノーマ、不妊症、インポテンス、無月経症、乳汁漏症、末端肥大症、キアリ・フロンメル (Chiari-Frommel) 症候群、アルゴンツ-デル・カスティロ (Argonz-del Castilo) 症候群、フォーベス・アルブライト (Forbes-Albright) 症候群、乳癌リンパ腫、シーハン症候群または精子形成異常の予防・治療剤を製造するための①請求項 2 2 記載の抗体、②請求項 2 9 記載のアンチセンス DNA または③請求項 1 または 2 記載のペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を阻害する化合物またはその塩の使用。
- 10

1/21

1

```

      9      18      27      36      45      54
5'  ATG GAA ATT ATT TCA TCA AAA CTA TTC ATT TTA TTG ACT TTA GCC ACT TCA AGC
    ---
    Met Glu Ile Ile Ser Ser Lys Leu Phe Ile Leu Leu Thr Leu Ala Thr Ser Ser

      63      72      81      90      99      108
    TTG TTA ACA TCA AAC ATT TTT TGT GCA GAT GAA TTA GTG ATG TCC AAT CTT CAC
    ---
    Leu Leu Thr Ser Asn Ile Phe Cys Ala Asp Glu Leu Val Met Ser Asn Leu His

      117      126      135      144      153      162
    AGC AAA GAA AAT TAT GAC AAA TAT TCT GAG CCT AGA GGA TAC CCA AAA GGG GAA
    ---
    Ser Lys Glu Asn Tyr Asp Lys Tyr Ser Glu Pro Arg Gly Tyr Pro Lys Gly Glu

      171      180      189      198      207      216
    AGA AGC CTC AAT TTT GAG GAA TTA AAA GAT TGG GGA CCA AAA AAT GTT ATT AAG
    ---
    Arg Ser Leu Asn Phe Glu Glu Leu Lys Asp Trp Gly Pro Lys Asn Val Ile Lys

      225      234      243      252      261      270
    ATG AGT ACA CCT GCA GTC AAT AAA ATG CCA CAC TCC TTC GCC AAC TTG CCA TTG
    ---
    Met Ser Thr Pro Ala Val Asn Lys Met Pro His Ser Phe Ala Asn Leu Pro Leu

      279      288      297      306      315      324
    AGA TTT GGG AGG AAC GTT CAA GAA GAA AGA AGT GCT GGA GCA ACA GCC AAC CTG
    ---
    Arg Phe Gly Arg Asn Val Gln Glu Glu Arg Ser Ala Gly Ala Thr Ala Asn Leu

      333      342      351      360      369      378
    CCT CTG AGA TCT GGA AGA AAT ATG GAG GTG AGC CTC GTG AGA CGT GTT CCT AAC
    ---
    Pro Leu Arg Ser Gly Arg Asn Met Glu Val Ser Leu Val Arg Arg Val Pro Asn

      387      396      405      414      423      432
    CTG CCC CAA AGG TTT GGG AGA ACA ACA ACA GCC AAA AGT GTC TGC AGG ATG CTG
    ---
    Leu Pro Gln Arg Phe Gly Arg Thr Thr Thr Ala Lys Ser Val Cys Arg Met Leu

      441      450      459      468      477      486
    AGT GAT TTG TGT CAA GGA TCC ATG CAT TCA CCA TGT GCC AAT GAC TTA TTT TAC
    ---
    Ser Asp Leu Cys Gln Gly Ser Met His Ser Pro Cys Ala Asn Asp Leu Phe Tyr

      495      504      513      522      531      540
    TCC ATG ACC TGC CAG CAC CAA GAA ATC CAG AAT CCC GAT CAA AAA CAG TCA AGG
    ---
    Ser Met Thr Cys Gln His Gln Glu Ile Gln Asn Pro Asp Gln Lys Gln Ser Arg

```

TAA 3'

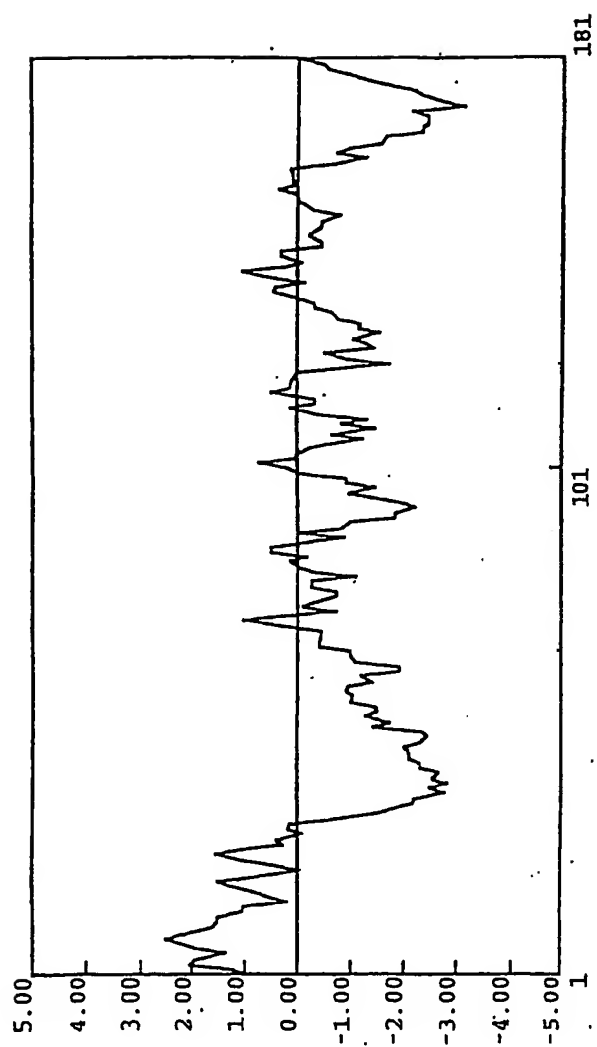
---

\*\*\*



2/21

2



3/21

 3

```

5'   9       18       27       36       45       54
    ATG GAA ATT ATT TCA TCA AAA CTA TTC ATT TTA TTG ACT TTA GCC ACT TCA AGC
    --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
    Met Glu Ile Ile Ser Ser Lys Leu Phe Ile Leu Leu Thr Leu Ala Thr Ser Ser

       63       72       81       90       99       108
    TTG TTA ACA TCA AAC ATT TTT TGT GCA GAT GAA TTA GTG ATG TCC AAT CTT CAC
    --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
    Leu Leu Thr Ser Asn Ile Phe Cys Ala Asp Glu Leu Val Met Ser Asn Leu His

       117      126      135      144      153      162
    AGC AAA GAA AAT TAT GAC AAA TAT TCT GAG CCT AGA GGA TAC CCA AAA GGG GAA
    --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
    Ser Lys Glu Asn Tyr Asp Lys Tyr Ser Glu Pro Arg Gly Tyr Pro Lys Gly Glu

       171      180      189      198      207      216
    AGA AGC CTC AAT TTT GAG GAA TTA AAA GAT TGG GGA CCA AAA AAT GTT ATT AAG
    --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
    Arg Ser Leu Asn Phe Glu Glu Leu Lys Asp Trp Gly Pro Lys Asn Val Ile Lys

       225      234      243      252      261      270
    ATG AGT ACA CCT GCA GTC AAT AAA ATG CCA CAC TCC TTC GCC AAC TTG CCA TTG
    --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
    Met Ser Thr Pro Ala Val Asn Lys Met Pro His Ser Phe Ala Asn Leu Pro Leu

       279      288      297      306      315      324
    AGA TTT GGG AGG AAC GTT CAA GAA GAA AGA AGT GCT GGA GCA ACA GCC AAC CTG
    --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
    Arg Phe Gly Arg Asn Val Gln Glu Glu Arg Ser Ala Gly Ala Thr Ala Asn Leu

       333      342      351      360      369      378
    CCT CTG AGA TCT GGA AGA AAT ATG GAG GTG AGC CTC GTG AGA CGT GTT CCT AAC
    --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
    Pro Leu Arg Ser Gly Arg Asn Met Glu Val Ser Leu Val Arg Arg Val Pro Asn

       387      396      405      414      423      432
    CTG CCC CAA AGG TTT GGG AGA ACA ACA ACA GCC AAA AGT GTC TGC AGG ATG CTG
    --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
    Leu Pro Gln Arg Phe Gly Arg Thr Thr Thr Ala Lys Ser Val Cys Arg Met Leu

       441      450      459      468      477      486
    AGT GAT TTG TGT CAA GGA TCC ATG CAT TCA CCA TGT GCC AAT GAC TTA TTT TAC
    --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
    Ser Asp Leu Cys Gln Gly Ser Met His Ser Pro Cys Ala Asn Asp Leu Phe Tyr

       495      504      513      522      531      540
    TCC ATG ACC TGC CAG CAC CAA GAA ATC CAG AAT CCC GAT CAA AAA CAG TCA AGG
    --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
    Ser Met Thr Cys Gln His Gln Glu Ile Gln Asn Pro Asp Gln Lys Gln Ser Arg

       549      558      567      576      585
    AGA CTG CTA TTC AAG AAA ATA GAT GAT GCA GAA TTG AAA CAA GAA AAA TAA 3'
    --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
    Arg Leu Leu Phe Lys Lys Ile Asp Asp Ala Glu Leu Lys Gln Glu Lys ***

```

4/21

 4

```

5'  ATG  GAA  ATT  ATT  TCA  TTA  AAA  CGA  TTC  ATT  TTA  TTG  ATG  TTA  GCC  ACT  TCA  AGC
    ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---
    Met  Glu  Ile  Ile  Ser  Leu  Lys  Arg  Phe  Ile  Leu  Leu  Met  Leu  Ala  Thr  Ser  Ser

      63      72      81      90      99      108
    TTG  TTA  ACA  TCA  AAC  ATC  TTC  TGC  ACA  GAC  GAA  TCA  AGG  ATG  CCC  AAT  CTT  TAC
    ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---
    Leu  Leu  Thr  Ser  Asn  Ile  Phe  Cys  Thr  Asp  Glu  Ser  Arg  Met  Pro  Asn  Leu  Tyr

      117      126      135      144      153      162
    AGC  AAA  AAG  AAT  TAT  GAC  AAA  TAT  TCC  GAG  CCT  AGA  GGA  GAT  CTA  GGC  TGG  GAG
    ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---
    Ser  Lys  Lys  Asn  Tyr  Asp  Lys  Tyr  Ser  Glu  Pro  Arg  Gly  Asp  Leu  Gly  Trp  Glu

      171      180      189      198      207      216
    AAA  GAA  AGA  AGT  CTT  ACT  TTT  GAA  GAA  GTA  AAA  GAT  TGG  GCT  CCA  AAA  ATT  AAG
    ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---
    Lys  Glu  Arg  Ser  Leu  Thr  Phe  Glu  Glu  Val  Lys  Asp  Trp  Ala  Pro  Lys  Ile  Lys

      225      234      243      252      261      270
    ATG  AAT  AAA  CCT  GTA  GTC  AAC  AAA  ATG  CCA  CCT  TCT  GCA  GCC  AAC  CTG  CCA  CTG
    ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---
    Met  Asn  Lys  Pro  Val  Val  Asn  Lys  Met  Pro  Pro  Ser  Ala  Ala  Asn  Leu  Pro  Leu

      279      288      297      306      315      324
    AGA  TTT  GGG  AGG  AAC  ATG  GAA  GAA  GAA  AGG  AGC  ACT  AGG  GCG  ATG  GCC  CAC  CTG
    ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---
    Arg  Phe  Gly  Arg  Asn  Met  Glu  Glu  Glu  Arg  Ser  Thr  Arg  Ala  Met  Ala  His  Leu

      333      342      351      360      369      378
    CCT  CTG  AGA  CTC  GGA  AAA  AAT  AGA  GAG  GAC  AGC  CTC  TCC  AGA  TGG  GTC  CCA  AAT
    ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---
    Pro  Leu  Arg  Leu  Gly  Lys  Asn  Arg  Glu  Asp  Ser  Leu  Ser  Arg  Trp  Val  Pro  Asn

      387      396      405      414      423      432
    CTG  CCC  CAG  AGG  TTT  GGA  AGA  ACA  ACA  GCC  AAA  AGC  ATT  ACC  AAG  ACC  CTG
    ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---
    Leu  Pro  Gln  Arg  Phe  Gly  Arg  Thr  Thr  Thr  Ala  Lys  Ser  Ile  Thr  Lys  Thr  Leu

      441      450      459      468      477      486
    AGT  AAT  TTG  CTC  CAG  CAG  TCC  ATG  CAT  TCA  CCA  TCT  ACC  AAT  GGG  CTA  CTC  TAC
    ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---
    Ser  Asn  Leu  Leu  Gln  Gln  Ser  Met  His  Ser  Pro  Ser  Thr  Asn  Gly  Leu  Leu  Tyr

      495      504      513      522      531      540
    TCC  ATG  GCC  TGC  CAG  CCC  CAA  GAA  ATC  CAG  AAT  CCT  GGT  CAA  AAG  AAC  CTA  AGG
    ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---
    Ser  Met  Ala  Cys  Gln  Pro  Gln  Glu  Ile  Gln  Asn  Pro  Gly  Gln  Lys  Asn  Leu  Arg

      549      558      567      576      585
    AGA  CGG  GGA  TTC  CAG  AAA  ATA  GAT  GAT  GCA  GAA  TTG  AAA  CAA  GAA  AAA  TAA  3'
    ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---
    Arg  Arg  Gly  Phe  Gln  Lys  Ile  Asp  Asp  Ala  Glu  Leu  Lys  Gln  Glu  Lys  ***

```

5/21

 5

```

5'   ATG GAA ATT ATT TCA   18   AAG CGA TTC   27   ATT TTA TTG ACT TTA   36   GCA ACT TCA AGC   54
      --- --- --- --- ---
      Met Glu Ile Ile Ser Ser Lys Arg Phe Ile Leu Leu Thr Leu Ala Thr Ser Ser

      63   72   81   90   99   108
      TTC TTA ACT TCA AAC ACC CTT TGT TCA GAT GAA TTA ATG ATG CCC CAT TTT CAC
      --- --- --- --- ---
      Phe Leu Thr Ser Asn Thr Leu Cys Ser Asp Glu Leu Met Met Pro His Phe His

      117   126   135   144   153   162
      AGC AAA GAA GGT TAT GGA AAA TAT TAC CAG CTG AGA GGA ATC CCA AAA GGG GTA
      --- --- --- --- ---
      Ser Lys Glu Gly Tyr Gly Lys Tyr Tyr Gln Leu Arg Gly Ile Pro Lys Gly Val

      171   180   189   198   207   216
      AAG GAA AGA AGT GTC ACT TTT CAA GAA CTC AAA GAT TGG GGG GCA AAG AAA GAT
      --- --- --- --- ---
      Lys Glu Arg Ser Val Thr Phe Gln Glu Leu Lys Asp Trp Gly Ala Lys Lys Asp

      225   234   243   252   261   270
      ATT AAG ATG AGT CCA GCC CCT GCC AAC AAA GTG CCC CAC TCA GCA GCC AAC CTT
      --- --- --- --- ---
      Ile Lys Met Ser Pro Ala Pro Ala Asn Lys Val Pro His Ser Ala Ala Asn Leu

      279   288   297   306   315   324
      CCC CTG AGG TTT GGG AGG AAC ATA GAA GAC AGA AGA AGC CCC AGG GCA CGG GCC
      --- --- --- --- ---
      Pro Leu Arg Phe Gly Arg Asn Ile Glu Asp Arg Arg Ser Pro Arg Ala Arg Ala

      333   342   351   360   369   378
      AAC ATG GAG GCA GGG ACC ATG AGC CAT TTT CCC AGC CTG CCC CAA AGG TTT GGG
      --- --- --- --- ---
      Asn Met Glu Ala Gly Thr Met Ser His Phe Pro Ser Leu Pro Gln Arg Phe Gly

      387   396   405   414   423   432
      AGA ACA ACA GCC AGA CGC ATC ACC AAG ACA CTG GCT GGT TTG CCC CAG AAA TCC
      --- --- --- --- ---
      Arg Thr Thr Ala Arg Arg Ile Thr Lys Thr Leu Ala Gly Leu Pro Gln Lys Ser

      441   450   459   468   477   486
      CTG CAC TCC CTG GCC TCC AGT GAA TCG CTC TAT GCC ATG ACC CGC CAG CAT CAA
      --- --- --- --- ---
      Leu His Ser Leu Ala Ser Ser Glu Ser Leu Tyr Ala Met Thr Arg Gln His Gln

      495   504   513   522   531   540
      GAA ATT CAG AGT CCT GGT CAA GAG CAA CCT AGG AAA CGG GTG TTC ACG GAA ACA
      --- --- --- --- ---
      Glu Ile Gln Ser Pro Gly Gln Glu Gln Pro Arg Lys Arg Val Phe Thr Glu Thr

      549   558   567   576   585   594
      GAT GAT GCA GAA AGG AAA CAA GAA AAA ATA GGA AAC CTC CAG CCA GTC CTT CAA
      --- --- --- --- ---
      Asp Asp Ala Glu Arg Lys Gln Glu Lys Ile Gly Asn Leu Gln Pro Val Leu Gln

      603   612
      GGG GCT ATG AAG CTG TGA 3'
      --- ---
      Gly Ala Met Lys Leu ***

```

6/21



hLPLRF.aa	1	10	20	30	40	50	
bLPLRF.aa	1	MELISSKRFI	LLTLATSSLL	TSNIFCADEI	VSNLHSEN	YDKYSEPRG	50
rLPLRF.aa	1	MELISSKRFI	LLTLATSSLL	TSNIFCIDDE	RMPNLSKN	YDKYSEPRG	50
	1	MELISSKRFI	LLTLATSSFL	TSNIFCSDEI	MMPHFSKEG	YDKYVQLRGI	50
hLPLRF.aa	51	--YPKG--	ER	SLNFEELKOW	GPRNVIRKMT	ANLPLRFGRN	100
bLPLRF.aa	51	LGWERI	ER	SLTFEEFKOW	APK--IKMKN	ANLPLRFGRN	100
rLPLRF.aa	51	---FKGVKER	SVTFDELKOW	GAKKUIKMS	APANKVPHSA	ANLPLRFGRN	100
hLPLRF.aa	101	VOEERSACAT	ANLPLRSGRN	MEVSLMRRVP	NLPQRFGRIT	TAKSVCRMIS	150
bLPLRF.aa	101	MEERSIRAM	ANLPLRLGN	REDLSLWVP	NLPQRFGRIT	TAKSITKTLS	150
rLPLRF.aa	101	IEDRSIRAR	ANM	---FAGTMSHFE	SLPQRFGRIT	AFRITKTILA	150
hLPLRF.aa	151	DIQGSMSH	CANDIEYSMT	COHQEIQNEP	OKQSRRLIFK	KIDDAELKQE	200
bLPLRF.aa	151	NLIQGSMSH	SINGLLYSTA	COHQEIQNEG	QKNLRRRQFQ	KIDDAELKQE	200
rLPLRF.aa	151	GLPQKSHST	ASSESLYMT	ROHQEIQSPG	QEDPRRNVET	ETDDAELKQE	200
hLPLRF.aa	201	K*	---	---	---	---	250
bLPLRF.aa	201	K*	---	---	---	---	250
rLPLRF.aa	201	KIGNLPQVLQ	GAMKL*	---	---	---	250

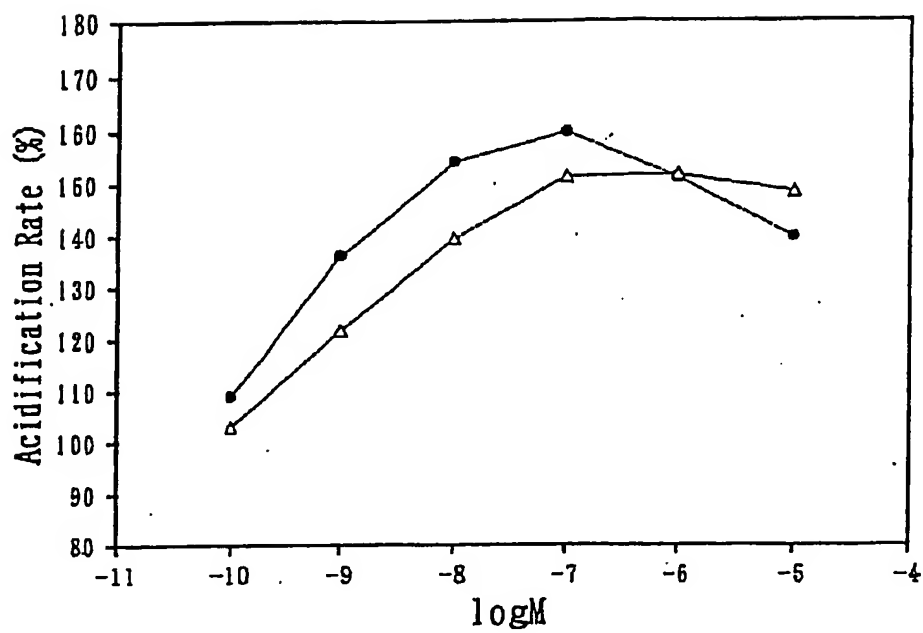
7/21

 7

1	TTTAGACTTAGACGAAATGGAAATTATTTTCATTAAAACGATTTCATTTTATTGACTGTG	58
1	MetGluIleIleSerLeuLysArgPheIleLeuLeuThrVal	14
59	GCAACTTCAAGCTTCTTAACATCAAACACCTTCTGTACAGATGAGTTCATGATGCCTCAT	118
15	AlaThrSerSerPheLeuThrSerAsnThrPheCysThrAspGluPheMetMetProHis	34
119	TTTCACAGCAAAGAAGGTGACGGAAAAATACTCCCAGCTGAGAGGAATCCCAAAAGGGGAA	178
35	PheHisSerLysGluGlyAspGlyLysTyrSerGlnLeuArgGlyIleProLysGlyGlu	54
179	AAGGAAAGAAGTGTCTAGTTTTCAGAACTAAAAGATTGGGGGGCAAAGAATGTTATTAAG	238
55	LysGluArgSerValSerPheGlnGluLeuLysAspTrpGlyAlaLysAsnValIleLys	74
239	ATGAGTCCAGCCCCTGCCAACAAAGTGCCCCACTCAGCAGCCAACCTGCCCTGAGATTT	298
75	MetSerProAlaProAlaAsnLysValProHisSerAlaAlaAsnLeuProLeuArgPhe	94
299	GGAAGGACCATAGATGAGAAAAGAAGCCCCGCAGCACGGGTCAACATGGAGGCAGGGACC	358
95	GlyArgThrIleAspGluLysArgSerProAlaAlaArgValAsnMetGluAlaGlyThr	114
359	AGGAGCCATTTCCCCAGCCTGCCCCAAAGGTTTGGGAGAACACAGCCAGAAGCCCCAAG	418
115	ArgSerHisPheProSerLeuProGlnArgPheGlyArgThrThrAlaArgSerProLys	134
419	ACACCCGCTGATTTGCCACAGAAACCCCTGCACTCACTGGGCTCCAGCGAGTTGCTCTAC	478
135	ThrProAlaAspLeuProGlnLysProLeuHisSerLeuGlySerSerGluLeuLeuTyr	154
479	GTCATGATCTGCCAGCACCAAGAAATTCAGAGTCCTGGTGGAAGCGAACGAGGAGAGGA	538
155	ValMetIleCysGlnHisGlnGluIleGlnSerProGlyGlyLysArgThrArgArgGly	174
539	GCGTTTGTGGAACAGATGATGCAGAAAGGAAACCAGAAAAATAGGAAACCTCGAGCCCG	598
175	AlaPheValGluThrAspAspAlaGluArgLysProGluLys***	188
599	ACTTCAAGAGGCTACGGAGC	618
188		188

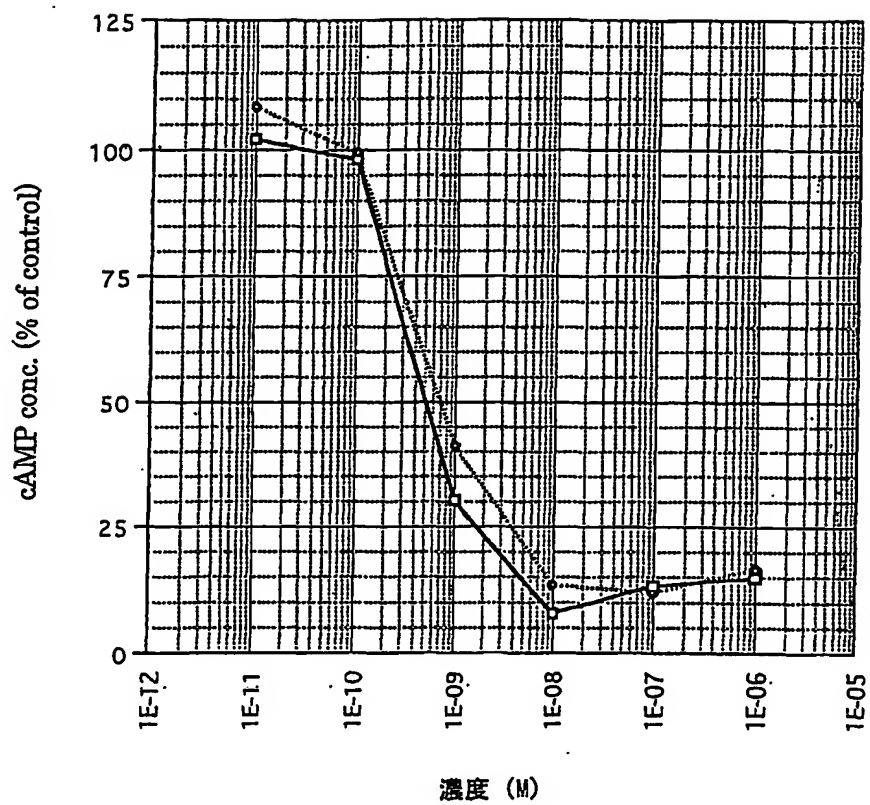
8/21

8



9/21

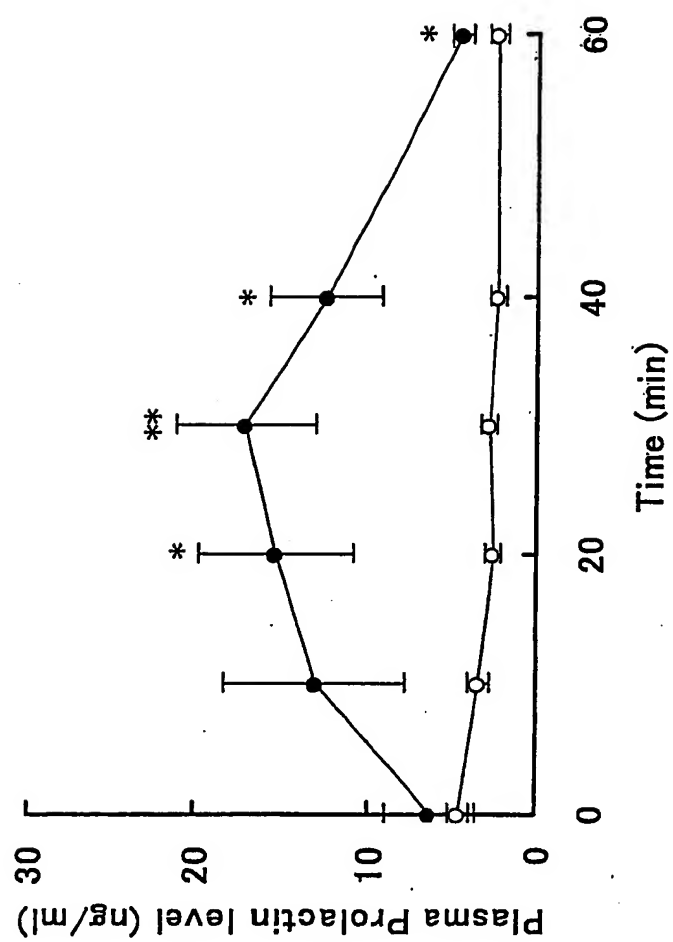
9





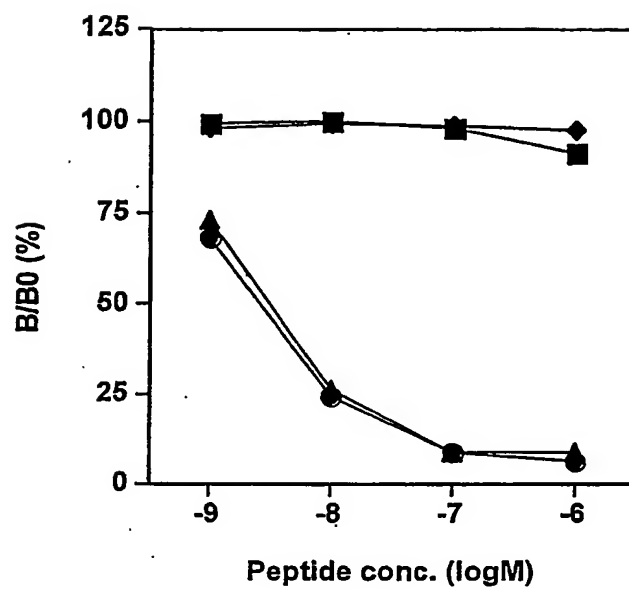
10/21

FIG. 1 O



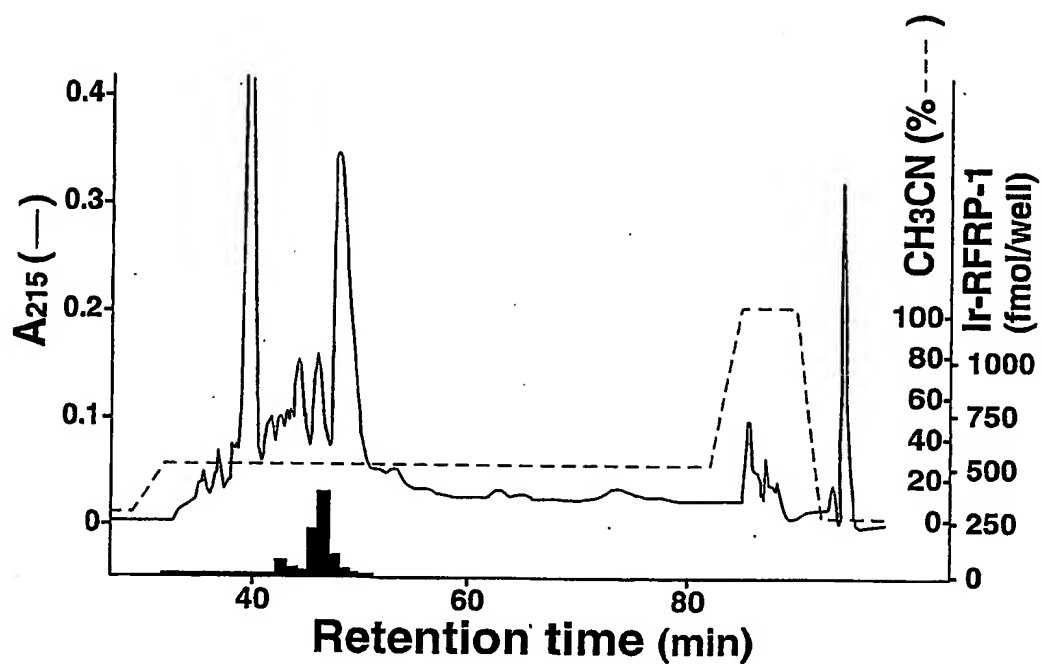
11/21

1 1



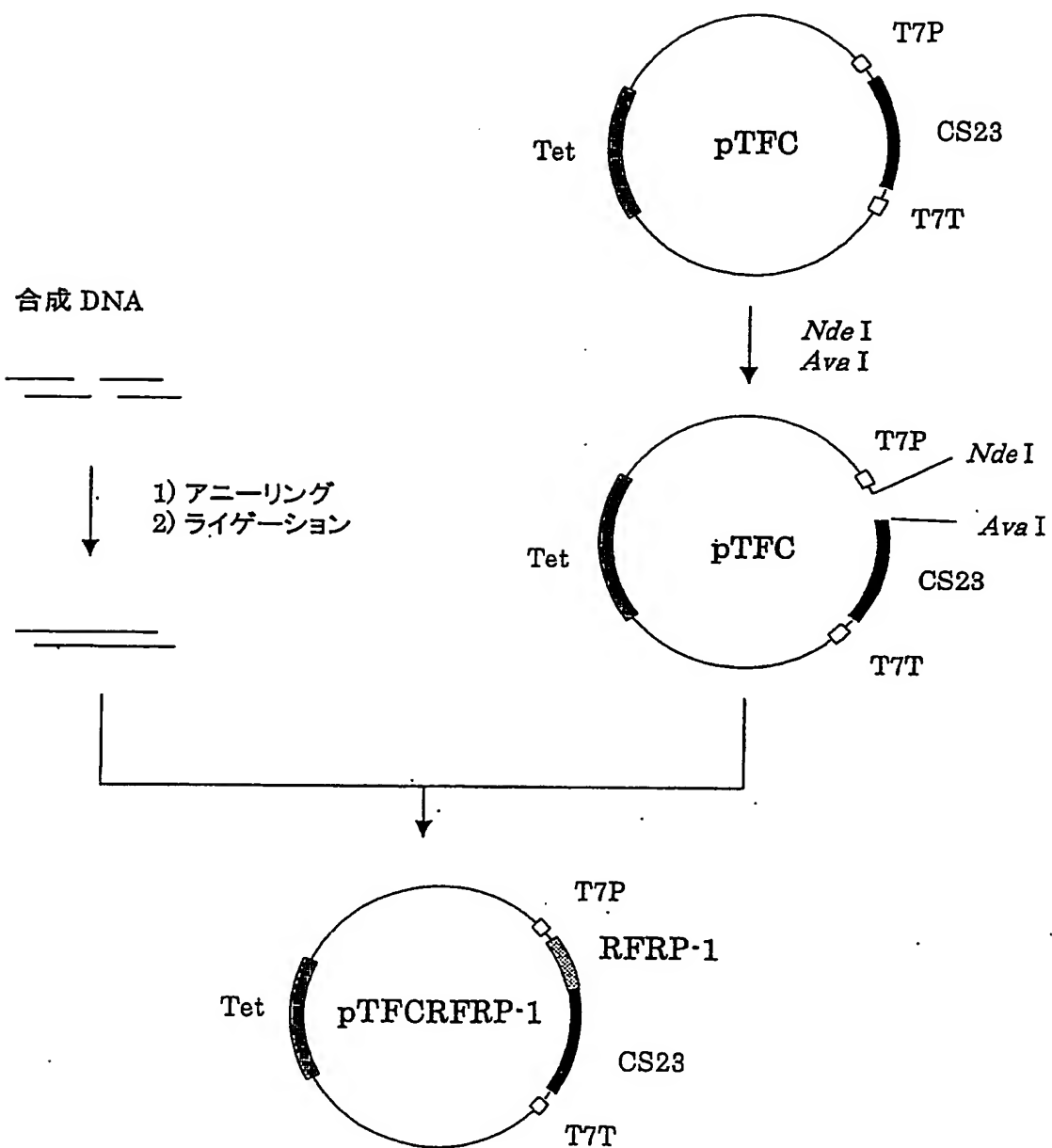
12/21

1 2



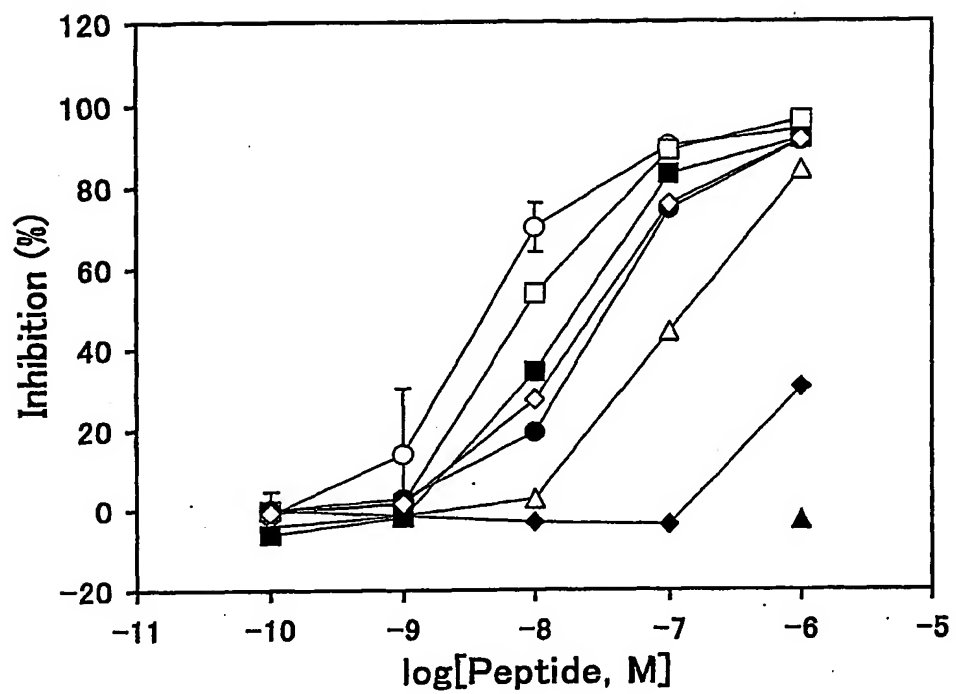
13/21

図 1 3



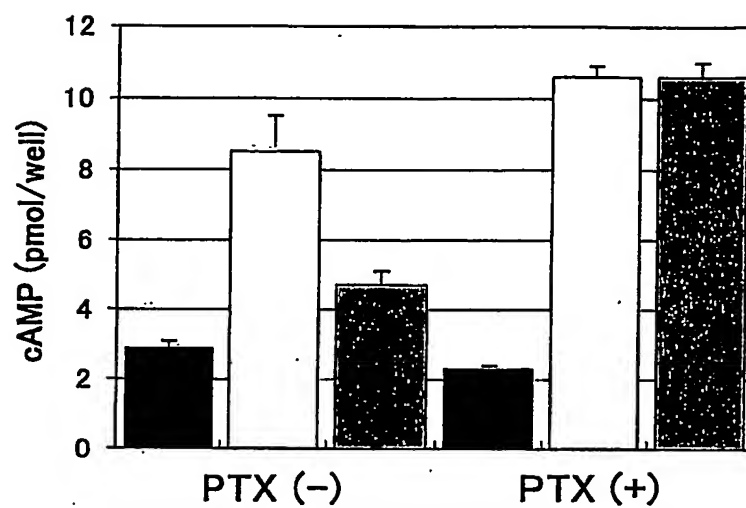
14/21

1 4



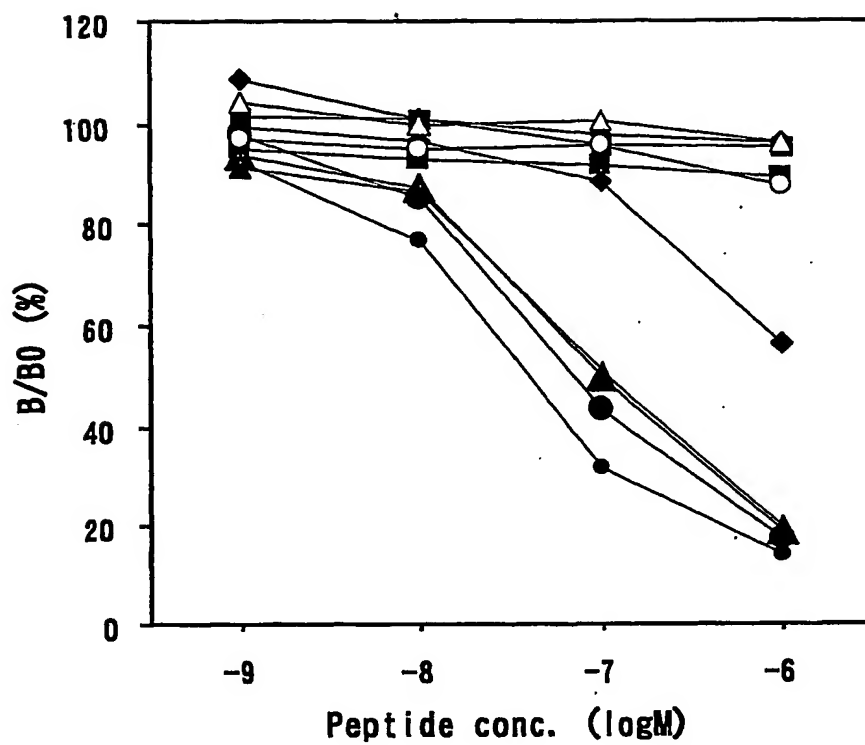
15/21

1 5



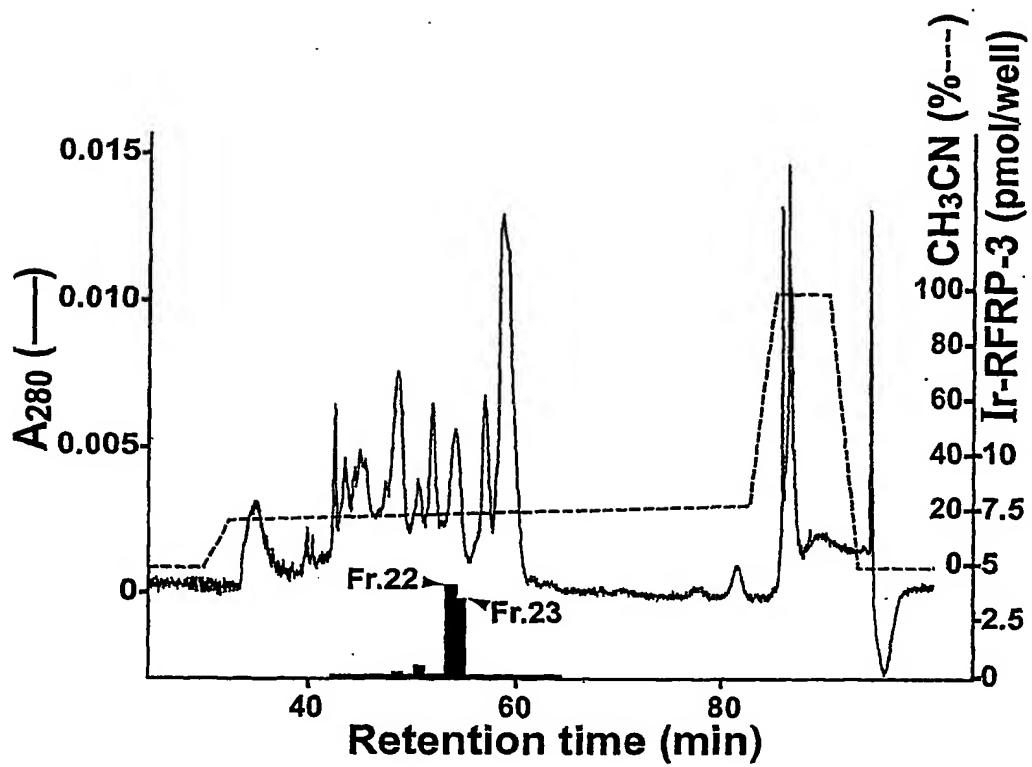
16/21

16



17/21

17





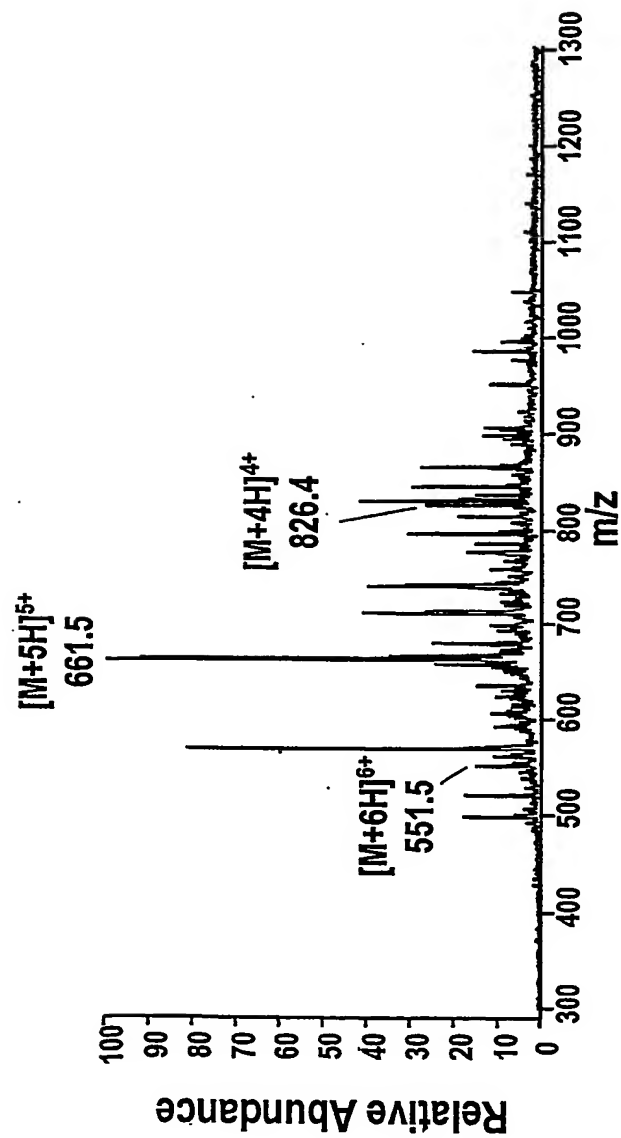
18/21

☒ 1 8

A-M-A-H-L-P-L-R-L-G-K-N-R-E-D-S-L-S-R-W-V

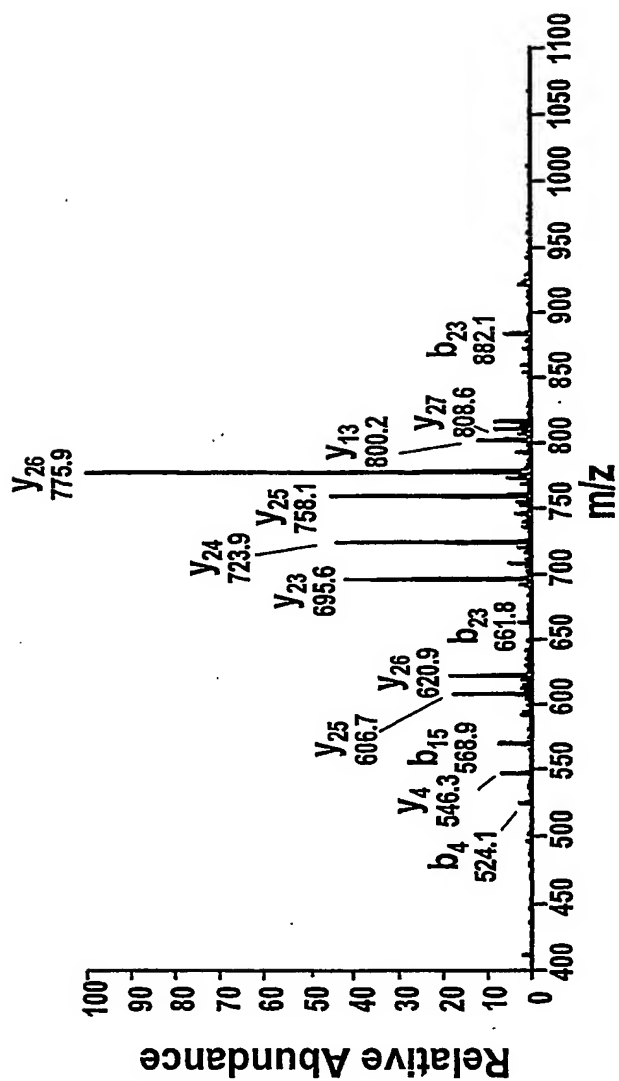
19/21

19



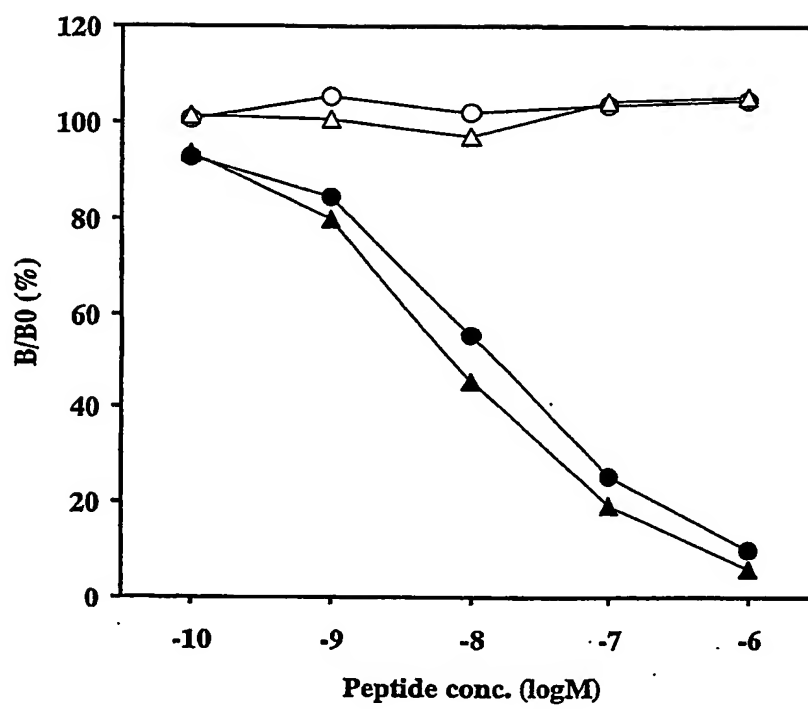
20/21

20



21/21

2 1



## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; Takeda Chemical Industries, Ltd.

&lt;120&gt; Novel RFRP-3 And Its DNA

&lt;130&gt; 2944W00P

&lt;150&gt; JP 2001-254826

&lt;151&gt; 2001-08-24

&lt;160&gt; 72

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 180

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 1

Met Glu Ile Ile Ser Ser Lys Leu Phe Ile Leu Leu Thr Leu Ala Thr

1 5 10 15

Ser Ser Leu Leu Thr Ser Asn Ile Phe Cys Ala Asp Glu Leu Val Met

20 25 30

Ser Asn Leu His Ser Lys Glu Asn Tyr Asp Lys Tyr Ser Glu Pro Arg

35 40 45

Gly Tyr Pro Lys Gly Glu Arg Ser Leu Asn Phe Glu Glu Leu Lys Asp

50 55 60

Trp Gly Pro Lys Asn Val Ile Lys Met Ser Thr Pro Ala Val Asn Lys

65 70 75 80

Met Pro His Ser Phe Ala Asn Leu Pro Leu Arg Phe Gly Arg Asn Val

85 90 95

Gln Glu Glu Arg Ser Ala Gly Ala Thr Ala Asn Leu Pro Leu Arg Ser

100 105 110

Gly Arg Asn Met Glu Val Ser Leu Val Arg Arg Val Pro Asn Leu Pro

115 120 125

Gln Arg Phe Gly Arg Thr Thr Thr Ala Lys Ser Val Cys Arg Met Leu

2/32

130	135	140	
Ser Asp Leu Cys Gln Gly Ser Met His Ser Pro Cys Ala Asn Asp Leu			
145	150	155	160
Phe Tyr Ser Met Thr Cys Gln His Gln Glu Ile Gln Asn Pro Asp Gln			
	165	170	175
Lys Gln Ser Arg			
180			

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 540

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 2

```

atggaaatta tttcatcaaa actattcatt ttattgactt tagccacttc aagcttgtaa 60
acatcaaaca ttttttgtgc agatgaatta gtgatgtcca atcttcacag caaagaaaaat 120
tatgacaaat attctgagcc tagaggatac ccaaaagggg aaagaagcct caattttgag 180
gaattaaaag attggggacc aaaaaatggtt attaagatga gtacacctgc agtcaataaa 240
atgccacact ccttcgccaa cttgccattg agatttggga ggaacgttca agaagaaaga 300
agtgtctggag caacagccaa cctgcctctg agatctgga agaaatatgga ggtgagcctc 360
gtgagacgtg ttcctaacct gcccacaaagg tttgggagaa caacaacagc caaaagtgtc 420
tgcaggatgc tgagtgattt gtgtcaagga tccatgcatt caccatgtgc caatgactta 480
ttttactcca tgacctgcca gcaccaagaa atccagaatc ccgatcaaaa acagtcaagg 540

```

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 3

gggctgcaca tagagactta attttag

27

<210> 4

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 4

ctagaccacc tctatataac tgcccat

27

<210> 5

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 5

gcacatagag acttaatttt agatttagac

30

<210> 6

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 6

catgcacttt gactggtttc caggtat

27

<210> 7

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 7

cagctttagg gacaggtcc aggtttc

27

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 196

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 8

Met Glu Ile Ile Ser Ser Lys Leu Phe Ile Leu Leu Thr Leu Ala Thr  
 1 5 10 15  
 Ser Ser Leu Leu Thr Ser Asn Ile Phe Cys Ala Asp Glu Leu Val Met  
 20 25 30  
 Ser Asn Leu His Ser Lys Glu Asn Tyr Asp Lys Tyr Ser Glu Pro Arg  
 35 40 45  
 Gly Tyr Pro Lys Gly Glu Arg Ser Leu Asn Phe Glu Glu Leu Lys Asp  
 50 55 60  
 Trp Gly Pro Lys Asn Val Ile Lys Met Ser Thr Pro Ala Val Asn Lys  
 65 70 75 80  
 Met Pro His Ser Phe Ala Asn Leu Pro Leu Arg Phe Gly Arg Asn Val  
 85 90 95  
 Gln Glu Glu Arg Ser Ala Gly Ala Thr Ala Asn Leu Pro Leu Arg Ser  
 100 105 110  
 Gly Arg Asn Met Glu Val Ser Leu Val Arg Arg Val Pro Asn Leu Pro  
 115 120 125  
 Gln Arg Phe Gly Arg Thr Thr Thr Ala Lys Ser Val Cys Arg Met Leu  
 130 135 140  
 Ser Asp Leu Cys Gln Gly Ser Met His Ser Pro Cys Ala Asn Asp Leu  
 145 150 155 160  
 Phe Tyr Ser Met Thr Cys Gln His Gln Glu Ile Gln Asn Pro Asp Gln



5/32

	165		170		175
Lys	Gln	Ser	Arg	Arg	Leu
			Leu	Phe	Lys
				Lys	Ile
				Asp	Asp
				Ala	Glu
				Leu	
	180		185		190
Lys	Gln	Glu	Lys		

195

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 588

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 9

```

atggaaatta tttcatcaaa actattcatt ttattgactt tagccacttc aagcttggtta 60
acatcaaaca tttttgtgc agatgaatta gtgatgtcca atcttcacag caaagaaaat 120
tatgacaaat attctgagcc tagaggatac ccaaaggagg aaagaagcct caattttgag 180
gaattaaaag attggggacc aaaaaatggtt attaagatga gtacacctgc agtcaataaa 240
atgccacact ccttcgcaa cttgccattg agatttggga ggaacgttca agaagaaaga 300
agtgtgtggag caacagccaa cctgcctctg agatctggaa gaaatatgga ggtgagcctc 360
gtgagacgtg ttcctaacct gcccacaaagg tttgggagaa caacaacagc caaaagtgtc 420
tgcaggatgc tgagtgattt gtgtcaagga tccatgcatt caccatgtgc caatgactta 480
ttttactcca tgacctgcca gcaccaagaa atccagaatc ccgatcaaaa acagtcaagg 540
agactgctat tcaagaaaat agatgatgca gaattgaaac aagaaaaa 588

```

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 10

gcctagagga gatctaggct gggagga

27

&lt;210&gt; 11

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 11

gggaggaaca tggaagaaga aaggagc

27

<210> 12

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 12

gatggtgaat gcatggactg ctggagc

27

<210> 13

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 13

ttcctcccaa atctcagtgg caggttg

27

<210> 14

<211> 196

<212> PRT

<213> Bovine

<400> 14

Met Glu Ile Ile Ser Leu Lys Arg Phe Ile Leu Leu Met Leu Ala Thr

7/32

1	5	10	15
Ser Ser Leu Leu Thr Ser Asn Ile Phe Cys Thr Asp Glu Ser Arg Met			
20	25	30	
Pro Asn Leu Tyr Ser Lys Lys Asn Tyr Asp Lys Tyr Ser Glu Pro Arg			
35	40	45	
Gly Asp Leu Gly Trp Glu Lys Glu Arg Ser Leu Thr Phe Glu Glu Val			
50	55	60	
Lys Asp Trp Ala Pro Lys Ile Lys Met Asn Lys Pro Val Val Asn Lys			
65	70	75	80
Met Pro Pro Ser Ala Ala Asn Leu Pro Leu Arg Phe Gly Arg Asn Met			
85	90	95	
Glu Glu Glu Arg Ser Thr Arg Ala Met Ala His Leu Pro Leu Arg Leu			
100	105	110	
Gly Lys Asn Arg Glu Asp Ser Leu Ser Arg Trp Val Pro Asn Leu Pro			
115	120	125	
Gln Arg Phe Gly Arg Thr Thr Thr Ala Lys Ser Ile Thr Lys Thr Leu			
130	135	140	
Ser Asn Leu Leu Gln Gln Ser Met His Ser Pro Ser Thr Asn Gly Leu			
145	150	155	160
Leu Tyr Ser Met Ala Cys Gln Pro Gln Glu Ile Gln Asn Pro Gly Gln			
165	170	175	
Lys Asn Leu Arg Arg Arg Gly Phe Gln Lys Ile Asp Asp Ala Glu Leu			
180	185	190	
Lys Gln Glu Lys			
195			

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 588

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Bovine

8/32

&lt;400&gt; 15

atggaaatta tttcattaaa acgattcatt ttattgatgt tagccacttc aagcttggtta 60  
acatcaaaca tcttctgcac agacgaatca aggatgccca atctttacag caaaaagaat 120  
tatgacaaat attccgagcc tagaggagat ctaggctggg agaaagaaag aagtcttact 180  
tttgaagaag taaaagattg ggctccaaaa attaagatga ataaacctgt agtcaacaaa 240  
atgccacctt ctgcagccaa cctgccactg agatttggga ggaacatgga agaagaaagg 300  
agcactaggg cgatggccca cctgcctctg agactcgga aaaatagaga ggacagcctc 360  
tccagatggg tcccaaattc gcccagagg ttggaagaa caacaacagc caaaagcatt 420  
accaagaccc tgagtaattt gctccagcag tccatgcatt caccatctac caatgggcta 480  
ctctactcca tggcctgcca gcccgaagaa atccagaatc ctggtcaaaa gaacctaaagg 540  
agacggggat tccagaaaat agatgatgca gaattgaaac aagaaaaa 588

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 16

ccctggggct tcttctgtct tctatgt 27

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 26

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 17

agcgattcat tttattgact ttagca 26

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 203

9/32

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Rat

&lt;400&gt; 18

Met Glu Ile Ile Ser Ser Lys Arg Phe Ile Leu Leu Thr Leu Ala Thr

1 5 10 15

Ser Ser Phe Leu Thr Ser Asn Thr Leu Cys Ser Asp Glu Leu Met Met

20 25 30

Pro His Phe His Ser Lys Glu Gly Tyr Gly Lys Tyr Tyr Gln Leu Arg

35 40 45

Gly Ile Pro Lys Gly Val Lys Glu Arg Ser Val Thr Phe Gln Glu Leu

50 55 60

Lys Asp Trp Gly Ala Lys Lys Asp Ile Lys Met Ser Pro Ala Pro Ala

65 70 75 80

Asn Lys Val Pro His Ser Ala Ala Asn Leu Pro Leu Arg Phe Gly Arg

85 90 95

Asn Ile Glu Asp Arg Arg Ser Pro Arg Ala Arg Ala Asn Met Glu Ala

100 105 110

Gly Thr Met Ser His Phe Pro Ser Leu Pro Gln Arg Phe Gly Arg Thr

115 120 125

Thr Ala Arg Arg Ile Thr Lys Thr Leu Ala Gly Leu Pro Gln Lys Ser

130 135 140

Leu His Ser Leu Ala Ser Ser Glu Ser Leu Tyr Ala Met Thr Arg Gln

145 150 155 160

His Gln Glu Ile Gln Ser Pro Gly Gln Glu Gln Pro Arg Lys Arg Val

165 170 175

Phe Thr Glu Thr Asp Asp Ala Glu Arg Lys Gln Glu Lys Ile Gly Asn

180 185 190

Leu Gln Pro Val Leu Gln Gly Ala Met Lys Leu

195 200

10/32

&lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 609

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Rat

&lt;400&gt; 19

```

atggaaatta tttcatcaaa gcgattcatt ttattgactt tagcaacttc aagcttctta   60
acttcaaaca cccttigtgc agatgaatta atgatgcccc attttcacag caaagaaggt  120
tatggaaaat attaccagct gagaggaatc caaaagggg taaaggaaag aagtgtcact  180
tttcaagaac tcaaagattg gggggcaaag aaagatatta agatgagtcc agcccctgcc  240
aacaaagtgc cccactcagc agccaacctt cccctgaggt ttgggaggaa catagaagac  300
agaagaagcc ccagggcacg ggccaacatg gaggcaggga ccatgagcca tttcccagc  360
ctgccccaaa ggtttgggag aacaacagcc agacgcatca ccaagacact ggctggtttg  420
ccccagaaat ccctgcactc cctggcctcc agtgaatcgc tctatgcat gaccgccag  480
catcaagaaa ttcagagtcc tggtaagag caacctagga aacgggtgtt cacggaaaca  540
gatgatgcag aaaggaaaca agaaaaaata ggaaacctcc agccagtcct tcaaggggct  600
atgaagctg                                     609

```

&lt;210&gt; 20

&lt;211&gt; 12

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 20

mgnttyggna ar

12

&lt;210&gt; 21

&lt;211&gt; 12

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223>

<400> 21

mgnttyggnm gn

12

<210> 22

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 22

mgnwsnggna ar

12

<210> 23

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 23

mgnwsnggnm gn

12

<210> 24

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 24

mgnytnggna ar

12

<210> 25

<211> 12

12/32

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 25

mgnytnggnm gn

12

&lt;210&gt; 26

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 26

gacttaattt tagatttaga caaatggaa

30

&lt;210&gt; 27

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 27

ttctcccaaa ctttggggc aggtt

25

&lt;210&gt; 28

&lt;211&gt; 28

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 28



acagcaaaga aggtgacgga aaatactc 28  
<210> 29  
<211> 28  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223>  
<400> 29  
atagatgaga aaagaagccc cgcagcac 28  
<210> 30  
<211> 28  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223>  
<400> 30  
gtgctgcggg gcttcttttc tcatttat 28  
<210> 31  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223>  
<400> 31  
tttagactta gacgaaatgg a 21  
<210> 32  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

14/32

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 32

gctccgtagc ctcttgaagt c

21

&lt;210&gt; 33

&lt;211&gt; 188

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mouse

&lt;400&gt; 33

Met Glu Ile Ile Ser Leu Lys Arg Phe Ile Leu Leu Thr Val Ala Thr

1 5 10 15

Ser Ser Phe Leu Thr Ser Asn Thr Phe Cys Thr Asp Glu Phe Met Met

20 25 30

Pro His Phe His Ser Lys Glu Gly Asp Gly Lys Tyr Ser Gln Leu Arg

35 40 45

Gly Ile Pro Lys Gly Glu Lys Glu Arg Ser Val Ser Phe Gln Glu Leu

50 55 60

Lys Asp Trp Gly Ala Lys Asn Val Ile Lys Met Ser Pro Ala Pro Ala

65 70 75 80

Asn Lys Val Pro His Ser Ala Ala Asn Leu Pro Leu Arg Phe Gly Arg

85 90 95

Thr Ile Asp Glu Lys Arg Ser Pro Ala Ala Arg Val Asn Met Glu Ala

100 105 110

Gly Thr Arg Ser His Phe Pro Ser Leu Pro Gln Arg Phe Gly Arg Thr

115 120 125

Thr Ala Arg Ser Pro Lys Thr Pro Ala Asp Leu Pro Gln Lys Pro Leu

130 135 140

His Ser Leu Gly Ser Ser Glu Leu Leu Tyr Val Met Ile Cys Gln His

145 150 155 160

15/32

Gln Glu Ile Gln Ser Pro Gly Gly Lys Arg Thr Arg Arg Gly Ala Phe

165

170

175

Val Glu Thr Asp Asp Ala Glu Arg Lys Pro Glu Lys

180

185

&lt;210&gt; 34

&lt;211&gt; 564

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Mouse

&lt;400&gt; 34

```

atggaaatta tticattaaa acgattcatt ttattgactg tggcaacttc aagcttctta 60
acatcaaaca cttctgtac agatgagttc atgatgcctc attttcacag caaagaaggt 120
gacggaaaat actcccagct gagaggaatc ccaaaggagg aaaaggaaag aagtgtcagt 180
tttcaagaac taaaagattg gggggcaaag aatgttatta agatgagtcc agcccctgcc 240
aacaagtgcc cccactcagc agccaacctg cccctgagat ttggaaggac catagatgag 300
aaaagaagcc ccgcagcacg ggtcaacatg gaggcaggga ccaggagcca ttccccagc 360
ctgccccaaa ggtttgggag aacaacagcc agaagcccca agacaccgcg tgatttgcca 420
cagaaacccc tgcactcact gggctccagc gagttgctct acgtcatgat ctgccagcac 480
caagaaattc agagtcttgg tggaaagcga acgaggagag gagcgtttgt ggaaacagat 540
gatgcagaaa ggaaaccaga aaaa 564

```

&lt;210&gt; 35

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 35

agtcgacagt atggaggcgg agccctc

27

&lt;210&gt; 36

&lt;211&gt; 29

16/32

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 36

gactagttca aatgttccag gccgggatg

29

&lt;210&gt; 37

&lt;211&gt; 432

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Rat

&lt;400&gt; 37

Met Glu Ala Glu Pro Ser Gln Pro Pro Asn Gly Ser Trp Pro Leu Gly

5

10

15

Gln Asn Gly Ser Asp Val Glu Thr Ser Met Ala Thr Ser Leu Thr Phe

20

25

30

Ser Ser Tyr Tyr Gln His Ser Ser Pro Val Ala Ala Met Phe Ile Ala

35

40

45

Ala Tyr Val Leu Ile Phe Leu Leu Cys Met Val Gly Asn Thr Leu Val

50

55

60

Cys Phe Ile Val Leu Lys Asn Arg His Met Arg Thr Val Thr Asn Met

65

70

75

80

Phe Ile Leu Asn Leu Ala Val Ser Asp Leu Leu Val Gly Ile Phe Cys

85

90

95

Met Pro Thr Thr Leu Val Asp Asn Leu Ile Thr Gly Trp Pro Phe Asp

100

105

110

Asn Ala Thr Cys Lys Met Ser Gly Leu Val Gln Gly Met Ser Val Ser

115

120

125

Ala Ser Val Phe Thr Leu Val Ala Ile Ala Val Glu Arg Phe Arg Cys

130

135

140

17/32

Ile Val His Pro Phe Arg Glu Lys Leu Thr Leu Arg Lys Ala Leu Phe  
 145                      150                      155                      160  
 Thr Ile Ala Val Ile Trp Ala Leu Ala Leu Leu Ile Met Cys Pro Ser  
                          165                      170                      175  
 Ala Val Thr Leu Thr Val Thr Arg Glu Glu His His Phe Met Leu Asp  
                          180                      185                      190  
 Ala Arg Asn Arg Ser Tyr Pro Leu Tyr Ser Cys Trp Glu Ala Trp Pro  
                          195                      200                      205  
 Glu Lys Gly Met Arg Lys Val Tyr Thr Ala Val Leu Phe Ala His Ile  
                          210                      215                      220  
 Tyr Leu Val Pro Leu Ala Leu Ile Val Val Met Tyr Val Arg Ile Ala  
 225                      230                      235                      240  
 Arg Lys Leu Cys Gln Ala Pro Gly Pro Ala Arg Asp Thr Glu Glu Ala  
                          245                      250                      255  
 Val Ala Glu Gly Gly Arg Thr Ser Arg Arg Arg Ala Arg Val Val His  
                          260                      265                      270  
 Met Leu Val Met Val Ala Leu Phe Phe Thr Leu Ser Trp Leu Pro Leu  
                          275                      280                      285  
 Trp Val Leu Leu Leu Leu Ile Asp Tyr Gly Glu Leu Ser Glu Leu Gln  
                          290                      295                      300  
 Leu His Leu Leu Ser Val Tyr Ala Phe Pro Leu Ala His Trp Leu Ala  
 305                      310                      315                      320  
 Phe Phe His Ser Ser Ala Asn Pro Ile Ile Tyr Gly Tyr Phe Asn Glu  
                          325                      330                      335  
 Asn Phe Arg Arg Gly Phe Gln Ala Ala Phe Arg Ala Gln Leu Cys Trp  
                          340                      345                      350  
 Pro Pro Trp Ala Ala His Lys Gln Ala Tyr Ser Glu Arg Pro Asn Arg  
                          355                      360                      365  
 Leu Leu Arg Arg Arg Val Val Val Asp Val Gln Pro Ser Asp Ser Gly

18/32

370	375	380	
Leu Pro Ser Glu Ser Gly Pro Ser Ser Gly Val Pro Gly Pro Gly Arg			
385	390	395	400
Leu Pro Leu Arg Asn Gly Arg Val Ala His Gln Asp Gly Pro Gly Glu			
	405	410	415
Gly Pro Gly Cys Asn His Met Pro Leu Thr Ile Pro Ala Trp Asn Ile			
	420	425	430

&lt;210&gt; 38

&lt;211&gt; 1299

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Rat

&lt;400&gt; 38

```

atggaggcgg agccctccca gcctcccaac ggcagctggc ccctgggtca gaacgggagt 60
gatgtggaga ccagcatggc aaccagcctc accttctcct cctactacca acactcctct 120
ccggtggcag ccatgttcat cgcggcctac gtgtcatctt tctcctctg catggtgggc 180
aacaccctgg tctgcttcat tgtgtcctaa aaccggcaca tgcgcactgt caccaacatg 240
tttatcctca acctggccgt cagcgacctg ctggtgggca tcttctgcat gccacaacc 300
cttgtggaca accttatcac tggttggcct ttgacaacg ccacatgcaa gatgagcggc 360
ttggtgcagg gcatgtccgt gtctgcatcg gttttcacac tggtgccat cgtgtggaa 420
aggttccgct gcatcgtgca cctttccgc gagaagctga cccttcggaa ggcgctgttc 480
accatcgagg tgatctgggc tctggcgtg ctcatcatgt gtccctcggc ggtcactctg 540
acagtcaccc gagaggagca tcacttcatg ctggatgctc gtaaccgctc ctaccgctc 600
tactcgtgct gggaggcctg gcccgagaag ggcagcgca aggtctacac cgcggtgctc 660
ttcgcgcaca tctacctggt gccgctggcg ctcatcgtag tgatgtacgt gcgcatcgcg 720
cgcaagctat gccaggcccc cggtcctgcg cgcgacacgg aggaggcggt ggccgagggt 780
ggccgcactt cgcgccgtag ggcccgcggt gtgcacatgc tggatcatgt ggcgctcttc 840
ttcacgttgt cctggctgcc actctgggtg ctgctgctgc tcatcgacta tggggagctg 900
agcgagctgc aactgcacct gctgtcggtc tacgccttcc ccttggcaca ctggctggcc 960
ttcttccaca gcagcgccaa ccccatcctc tacggctact tcaacgagaa cttccgccgc 1020

```

19/32

ggcttccagg ctgccttccg tgcacagctc tgctggcctc cctgggccgc ccacaagcaa 1080  
gcctactcgg agcgggccaa ccgcctcctg cgcaggcggg tgggtggtgga cgtgcaaccc 1140  
agcgactccg gcctgccatc agagtctggc cccagcagcg ggggtcccagg gcctggccgg 1200  
ctgccactgc gcaatgggcg tgtggcccat caggatggcc cgggggaagg gccaggctgc 1260  
aaccacatgc ccctcacat cccggcctgg aacatttga 1299

&lt;210&gt; 39

&lt;211&gt; 12

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> the C-terminus of the polypeptide is amide (-CONH<sub>2</sub>) form

&lt;400&gt; 39

Met Pro His Ser Phe Ala Asn Leu Pro Leu Arg Phe

1

5

10

&lt;210&gt; 40

&lt;211&gt; 8

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> the C-terminus of the polypeptide is amide (-CONH<sub>2</sub>) form

&lt;400&gt; 40

Val Pro Asn Leu Pro Gln Arg Phe

1

5

&lt;210&gt; 41

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> the C-terminus of the polypeptide is amide (-CONH<sub>2</sub>) form

20/32

&lt;400&gt; 41

Ser Ala Gly Ala Thr Ala Asn Leu Pro Arg Ser

1 5 10

&lt;210&gt; 42

&lt;211&gt; 36

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 42

atgccacact ccttcgcca cttgccattg agattt 36

&lt;210&gt; 43

&lt;211&gt; 36

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 43

agtgcctggag caacagccaa cctgcctctg agatct 36

&lt;210&gt; 44

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 44

gttcctaacc tgccccaag gttt 24

&lt;210&gt; 45

&lt;211&gt; 276

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 45

atggaaatta tttcatcaaa actattcatt ttattgactt tagccacttc aagcttgta 60  
acatcaaaca ttttttgtgc agatgaatta gtgatgtcca atcttcacag caaagaaaat 120  
tatgacaaat attctgagcc tagaggatac ccaaaagggg aaagaagcct caattttgag 180



21/32

gaattaaaag attggggacc aaaaaatgtt attaagatga gtacacctgc agtcaataaa 240  
atgccacact ccttcgcaa cttgccattg agattt 276

&lt;210&gt; 46

&lt;211&gt; 336

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 46

atggaaatta tttcatcaaa actattcatt ttattgactt tagccacttc aagcttgta 60  
acatcaaaca ttttttgtgc agatgaatta gtgatgtcca atcttcacag caaagaaaat 120  
tatgacaaat attctgagcc tagaggatac caaaaggagg aaagaagcct caattttgag 180  
gaattaaaag attggggacc aaaaaatgtt attaagatga gtacacctgc agtcaataaa 240  
atgccacact ccttcgcaa cttgccattg agatttggga ggaacgttca agaagaaaga 300  
agtgcctggag caacagccaa cctgcctctg agatct 336

&lt;210&gt; 47

&lt;211&gt; 393

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 47

atggaaatta tttcatcaaa actattcatt ttattgactt tagccacttc aagcttgta 60  
acatcaaaca ttttttgtgc agatgaatta gtgatgtcca atcttcacag caaagaaaat 120  
tatgacaaat attctgagcc tagaggatac caaaaggagg aaagaagcct caattttgag 180  
gaattaaaag attggggacc aaaaaatgtt attaagatga gtacacctgc agtcaataaa 240  
atgccacact ccttcgcaa cttgccattg agatttggga ggaacgttca agaagaaaga 300  
agtgcctggag caacagccaa cctgcctctg agatctgga agaaatatgga ggtgagcctc 360  
gtgagacgtg ttcctaacct gcccacaaagg ttt 393

&lt;210&gt; 48

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

22/32

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 48

ccctggggct tcttctgtct tctatgt

27

&lt;210&gt; 49

&lt;211&gt; 26

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 49

agcgattcat tttattgact ttagca

26

&lt;210&gt; 50

&lt;211&gt; 203

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Rat

&lt;400&gt; 50

Met Glu Ile Ile Ser Ser Lys Arg Phe Ile Leu Leu Thr Leu Ala Thr

1 5 10 15

Ser Ser Phe Leu Thr Ser Asn Thr Leu Cys Ser Asp Glu Leu Met Met

20 25 30

Pro His Phe His Ser Lys Glu Gly Tyr Gly Lys Tyr Tyr Gln Leu Arg

35 40 45

Gly Ile Pro Lys Gly Val Lys Glu Arg Ser Val Thr Phe Gln Glu Leu

50 55 60

Lys Asp Trp Gly Ala Lys Lys Asp Ile Lys Met Ser Pro Ala Pro Ala

65 70 75 80

Asn Lys Val Pro His Ser Ala Ala Asn Leu Pro Leu Arg Phe Gly Arg

85 90 95

23/32

Asn Ile Glu Asp Arg Arg Ser Pro Arg Ala Arg Ala Asn Met Glu Ala  
                     100                    105                    110  
 Gly Thr Met Ser His Phe Pro Ser Leu Pro Gln Arg Phe Gly Arg Thr  
                     115                    120                    125  
 Thr Ala Arg Arg Ile Thr Lys Thr Leu Ala Gly Leu Pro Gln Lys Ser  
                     130                    135                    140  
 Leu His Ser Leu Ala Ser Ser Glu Leu Leu Tyr Ala Met Thr Arg Gln  
 145                    150                    155                    160  
 His Gln Glu Ile Gln Ser Pro Gly Gln Glu Gln Pro Arg Lys Arg Val  
                     165                    170                    175  
 Phe Thr Glu Thr Asp Asp Ala Glu Arg Lys Gln Glu Lys Ile Gly Asn  
                     180                    185                    190  
 Leu Gln Pro Val Leu Gln Gly Ala Met Lys Leu  
                     195                    200

&lt;210&gt; 51

&lt;211&gt; 609

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Rat

&lt;400&gt; 51

atggaaatta tttcatcaaa gcgattcatt ttattgactt tagcaacttc aagcttctta 60  
 acttcaaaca ccctttgttc agatgaatta atgatgcccc attttcacag caaagaaggt 120  
 tatggaaaat attaccagct gagaggaatc caaaaggagg taaaggaaag aagtgtcact 180  
 tttcaagaac tcaaagattg gggggcaaag aaagatatta agatgagtcc agcccctgcc 240  
 aacaaagtgc ccactcagc agccaacctt ccctgaggt ttgggaggaa catagaagac 300  
 agaagaagcc ccagggcacg ggccaacatg gaggcaggga ccatgagcca ttttcccagc 360  
 ctgccccaaa ggtttgggag aacaacagcc agacgcatca ccaagacact ggctggtttg 420  
 ccccgaaat ccctgcactc cctggcctcc agtgaattgc tctatgcat gaccgccag 480  
 catcaagaaa ttcagagtcc tgggtcaagag caacctagga aacgggtgtt cacggaaaca 540  
 gatgatgcag aaaggaaaca agaaaaata ggaaacctcc agccagtcct tcaaggggct 600

24/32

atgaagctg

609

&lt;210&gt; 52

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 52

ttctagattt tggacaaaat ggaaatt

27

&lt;210&gt; 53

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 53

cgtctttagg gacaggctcc agatttc

27

&lt;210&gt; 54

&lt;211&gt; 430

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 54

Met Glu Gly Glu Pro Ser Gln Pro Pro Asn Ser Ser Trp Pro Leu Ser

1 5 10 15

Gln Asn Gly Thr Asn Thr Glu Ala Thr Pro Ala Thr Asn Leu Thr Phe

20 25 30

Ser Ser Tyr Tyr Gln His Thr Ser Pro Val Ala Ala Met Phe Ile Val

35 40 45

Ala Tyr Ala Leu Ile Phe Leu Leu Cys Met Val Gly Asn Thr Leu Val

25/32

50	55	60
Cys Phe Ile Val Leu Lys Asn Arg His Met His Thr Val Thr Asn Met		
65	70	75
Phe Ile Leu Asn Leu Ala Val Ser Asp Leu Leu Val Gly Ile Phe Cys		
85	90	95
Met Pro Thr Thr Leu Val Asp Asn Leu Ile Thr Gly Trp Pro Phe Asp		
100	105	110
Asn Ala Thr Cys Lys Met Ser Gly Leu Val Gln Gly Met Ser Val Ser		
115	120	125
Ala Ser Val Phe Thr Leu Val Ala Ile Ala Val Glu Arg Phe Arg Cys		
130	135	140
Ile Val His Pro Phe Arg Glu Lys Leu Thr Leu Arg Lys Ala Leu Val		
145	150	155
Thr Ile Ala Val Ile Trp Ala Leu Ala Leu Leu Ile Met Cys Pro Ser		
165	170	175
Ala Val Thr Leu Thr Val Thr Arg Glu Glu His His Phe Met Val Asp		
180	185	190
Ala Arg Asn Arg Ser Tyr Pro Leu Tyr Ser Cys Trp Glu Ala Trp Pro		
195	200	205
Glu Lys Gly Met Arg Arg Val Tyr Thr Thr Val Leu Phe Ser His Ile		
210	215	220
Tyr Leu Ala Pro Leu Ala Leu Ile Val Val Met Tyr Ala Arg Ile Ala		
225	230	235
Arg Lys Leu Cys Gln Ala Pro Gly Pro Ala Pro Gly Gly Glu Glu Ala		
245	250	255
Ala Asp Pro Arg Ala Ser Arg Arg Arg Ala Arg Val Val His Met Leu		
260	265	270
Val Met Val Ala Leu Phe Phe Thr Leu Ser Trp Leu Pro Leu Trp Ala		
275	280	285

26/32

Leu Leu Leu Leu Ile Asp Tyr Gly Gln Leu Ser Ala Pro Gln Leu His  
 290 295 300  
 Leu Val Thr Val Tyr Ala Phe Pro Phe Ala His Trp Leu Ala Phe Phe  
 305 310 315 320  
 Asn Ser Ser Ala Asn Pro Ile Ile Tyr Gly Tyr Phe Asn Glu Asn Phe  
 325 330 335  
 Arg Arg Gly Phe Gln Ala Ala Phe Arg Ala Arg Leu Cys Pro Arg Pro  
 340 345 350  
 Ser Gly Ser His Lys Glu Ala Tyr Ser Glu Arg Pro Gly Gly Leu Leu  
 355 360 365  
 His Arg Arg Val Phe Val Val Val Arg Pro Ser Asp Ser Gly Leu Pro  
 370 375 380  
 Ser Glu Ser Gly Pro Ser Ser Gly Ala Pro Arg Pro Gly Arg Leu Pro  
 385 390 395 400  
 Leu Arg Asn Gly Arg Val Ala His His Gly Leu Pro Arg Glu Gly Pro  
 405 410 415  
 Gly Cys Ser His Leu Pro Leu Thr Ile Pro Ala Trp Asp Ile  
 420 425 430

&lt;210&gt; 55

&lt;211&gt; 1290

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 55

atggaggggg agccctccca gcctcccaac agcagttggc ccctaagtca gaatgggact 60  
 aacactgagg ccaccccggc tacaacctc accttctcct cctactatca gcacacctcc 120  
 cctgtggcgg ccatgttcat tgtggcctat gcgctcatct tctgtctctg catggtgggc 180  
 aacaccctgg tctgtttcat cgtgctcaag aaccggcaca tgcatactgt caccaacatg 240  
 ttcatactca acctggctgt cagtgcctg ctgggtgggca tcttctgcat gccaccacc 300  
 cttgtggaca acctcatcac tgggtggccc ttcgacaatg ccacatgcaa gatgagcggc 360

27/32

```

ttggtgcagg gcatgtctgt gtcggcttcc gttttcacac tgggtggccat tgctgtggaa 420
aggttccgct gcatcgtgca ccctttccgc gagaagctga ccctgcggaa ggcgctcgtc 480
accatcgccg tcatctgggc cctggcgctg ctcatcatgt gtccctcggc cgtcacgctg 540
accgtcaccc gtgaggagca ccacttcatg gtggacgccc gcaaccgctc ctaccctctc 600
tactcctgct gggaggcctg gcccgagaag ggcatgcgca gggctctacac cactgtgctc 660
ttctcgcaca tctacctggc gccgctggcg ctcatcgtgg tcatgtacgc ccgcatcgcg 720
cgcaagctct gccaggcccc gggcccgccc ccgggggcg aggaggctgc ggacccgca 780
gcatcgccgc gcagagcgcg cgtggtgcac atgctgggtca tgggtggcgt gttcttcacg 840
ctgtcctggc tgccgctctg ggcgctgctg ctgctcatcg actacgggca gctcagcgcg 900
ccgcagctgc acctggtcac cgtctacgcc ttccccttcg cgcactggct ggcccttctc 960
aacagcagcg ccaaccccat catctacggc tacttcaacg agaacttccg ccgeggcttc 1020
caggccgcct tccgcgcccg cctctgcccg cgcccgtcgg ggagccacaa ggaggcctac 1080
tccgagcggc ccggcgggct tctgcacagg cgggtcttcg tgggtggtgcg gccagcgac 1140
tccgggctgc cctctgagtc gggccctagc agtggggccc ccaggcccgg ccgcctcccg 1200
ctgcggaatg ggcgggtggc tcaccacggc ttgccaggg aagggcctgg ctgctccac 1260
ctgcccctca ccattccagc ctgggatatc 1290

```

&lt;210&gt; 56

&lt;211&gt; 1290

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 56

```

atggaggggg agccctccca gcctcccaac agcagttggc ccctaagtca gaatgggact 60
aacactgagg ccaccccggc tacaacctc accttctcct cctactatca gcacacctcc 120
cctgtggcgg ccatgttcat tgtggcctat gcgctcatct tctgtctctg catggtgggc 180
aacaccctgg tctgtttcat cgtgctcaag aaccggcaca tgcatactgt caccaacatg 240
ttcatcctca acctggctgt cagtgaacctg ctggtgggca tcttctgcat gccaccacc 300
cttgtggaca acctcatcac tgggtggccc ttcgacaatg ccacatgcaa gatgagcggc 360
ttggtgcagg gcatgtctgt gtcggcttcc gttttcacac tgggtggccat tgctgtggaa 420
aggttccgct gcatcgtgca ccctttccgc gagaagctga ccctgcggaa ggcgctcgtc 480

```

28/32

accatcgccg tcattctgggc cctggcgctg ctcatcatgt gtccctcggc cgtcacgctg 540  
 accgtcaccg gtgaggagca ccacttcatg gtggacgccc gcaaccgctc ctaccgctc 600  
 tactcctgct gggaggcctg gcccgagaag ggcatgcgca gggctctacac cactgtgctc 660  
 ttctcgcaca tctacctggc gccgctggcg ctcatcgtgg tcatgtacgc ccgcatcgcg 720  
 cgcaagctct gccaggcccc gggcccgggc cccggggggc aggaggctgc ggaccgcga 780  
 gcatcgcggc gcagagcgcg cgtgggtgac atgctgggtca tgggtggcgct gttcttcacg 840  
 ctgtcctggc tgccgctctg ggcgctgctg ctgctcatcg actacgggca gctcagcgcg 900  
 ccgcagctgc acctgggtcac cgtctacgcc ttccccttcg cgactgggt ggccttcttc 960  
 aacagcagcg ccaaccccat catctacggc tacttcaacg agaacttccg ccgcggcttc 1020  
 caggccgcct tccgcgcccg cctctgcccg cgcccgtcgg ggagccacaa ggaggcctac 1080  
 tccgagcggc ccggcgggct tctgcacagg cgggtcttcg tgggtgggtgc gccacgcgac 1140  
 tccgggctgc cctctgagtc gggccctagc agtggggccc ccaggcccgg ccgcctcccg 1200  
 ctgcggaatg ggcgggtggc tcaccacggc ttgccaggg aagggcctgg ctgctccac 1260  
 ctgcccctca ccattccagc ctgggatatc 1290

&lt;210&gt; 57

&lt;211&gt; 31

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 57

gtcgacatgg agggggagcc ctcccagcct c

31

&lt;210&gt; 58

&lt;211&gt; 29

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 58



29/32

actagttcag atatcccagg ctggaatgg

29

&lt;210&gt; 59

&lt;211&gt; 57

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Primer

&lt;400&gt; 59

tatgagcctg aactttgaag aactgaaagat tgggggtccga aaaatgtgat taaaatg

57

&lt;210&gt; 60

&lt;211&gt; 61

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Primer

&lt;400&gt; 60

agcaccgccg cggtgaataa aatgccgcat agctttgcga atctgccgct gcgtttttgc

60

c

61

&lt;210&gt; 61

&lt;211&gt; 62

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Primer

&lt;400&gt; 61

gggtgctcatt ttaatcacat ttttcggacc ccaatctttc agttcttcaa agttcaggct

60

ca

62

&lt;210&gt; 62

&lt;211&gt; 59

30/32

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Primer

&lt;400&gt; 62

tcggggcaaa aacgcagcgg cagattcgca aagctatgcg gcattttatt caccgccgg 59

&lt;210&gt; 63

&lt;211&gt; 28

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 63

Ala Thr Ala Asn Leu Pro Leu Arg Ser Gly Arg Asn Met Glu Val Ser

1 5 10 15

Leu Val Arg Arg Val Pro Asn Leu Pro Gln Arg Phe

20 25

&lt;210&gt; 64

&lt;211&gt; 84

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 64

gcaacagcca acctgcctct gagatctgga agaaatatgg aggtgagcct cgtgagacgt 60

gttcctaacc tgccccaag gttt 84

&lt;210&gt; 65

&lt;211&gt; 31

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 65

Ser Ala Gly Ala Thr Ala Asn Leu Pro Leu Arg Ser Gly Arg Asn Met

1 10 15

31/32

Glu Val Ser Leu Val Arg Arg Val Pro Asn Leu Pro Gln Arg Phe

20

25

30

&lt;210&gt; 66

&lt;211&gt; 93

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 66

agtgctggag caacagccaa cctgcctctg agatctggaa gaaatatgga ggtgagcctc 60

gtgagacgtg ttcctaacct gccccaaagg ttt 93

&lt;210&gt; 67

&lt;211&gt; 28

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Bovine

&lt;400&gt; 67

Ala Met Ala His Leu Pro Leu Arg Leu Gly Lys Asn Arg Glu Asp Ser

1

5

10

15

Leu Ser Arg Trp Val Pro Asn Leu Pro Gln Arg Phe

20

25

&lt;210&gt; 68

&lt;211&gt; 84

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Bovine

&lt;400&gt; 68

gcgatggccc acctgcctct gagactcgga aaaaatagag aggacagcct ctccagatgg 60

gtcccaaate tgccccagag gttt 84

&lt;210&gt; 69

&lt;211&gt; 5

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

32/32

&lt;400&gt; 69

Leu Pro Gln Arg Phe

1 5

&lt;210&gt; 70

&lt;211&gt; 6

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;400&gt; 70

Asn. Leu Pro Gln Arg Phe

1 5

&lt;210&gt; 71

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;400&gt; 71

Pro Asn Leu Pro Gln Arg Phe

1 5

&lt;210&gt; 72

&lt;211&gt; 8

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;400&gt; 72

Val Pro Asn Leu Pro Gln Arg Phe

1 5

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/08466

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/09, C07K7/08, C07K14/705, C07K16/28, C12N5/10,  
C12P21/08, C12Q1/68, A61K38/17, A61K39/395, A61K48/00,  
G01N33/15, G01N33/50, G01N33/53, G01N33/566, G01N33/577

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/09, C07K7/08, C07K14/705, C07K16/28, C12N5/10,  
C12P21/08, C12Q1/68, A61K38/17, A61K39/395, A61K48/00,  
G01N33/15, G01N33/50, G01N33/53, G01N33/566, G01N33/577

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

SwissProt/PIR/Geneseq, GenBank/EMBL/DDBJ/Geneseq, WPI (DIALOG),  
BIOSIS (DIALOG), JICST FILE (JOIS)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 00/29441 A1 (Takeda Chemical Industries), 25 May, 2000 (25.05.00), & EP 1132405 A1 & JP 2001-149072 A	1-35, 47-50
A	HINUMA, S. et al., New neuropeptides containing carboxy-terminal RFamide and their receptor in mammals. Nature Cell Biology, Vol.2, pages 703 to 708 (2002)	1-35, 47-50

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:  
"A" document defining the general state of the art which is not  
considered to be of particular relevance  
"E" earlier document but published on or after the international filing  
date  
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is  
cited to establish the publication date of another citation or other  
special reason (as specified)  
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other  
means  
"P" document published prior to the international filing date but later  
than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or  
priority date and not in conflict with the application but cited to  
understand the principle or theory underlying the invention  
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be  
considered novel or cannot be considered to involve an inventive  
step when the document is taken alone  
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be  
considered to involve an inventive step when the document is  
combined with one or more other such documents, such  
combination being obvious to a person skilled in the art  
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
28 November, 2002 (28.11.02)

Date of mailing of the international search report  
10 December, 2002 (10.12.02)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/08466

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 43-46

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

The inventions as set forth in these claims pertain to methods for treatment of the human body by therapy.

2. ☒ Claims Nos.: 36-42

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

Concerning the "compound" and the "drug" as set forth in these claims, no specific compound or drug corresponding thereto but a general method of selecting a desired "compound" using the protein of the invention is merely presented in the description. Thus, it is unknown (continued to extra sheet)

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6A(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/08466

Continuation of Box No.I-2 of continuation of first sheet(1)

what specific substances are involved in the scopes of the above "compound" and "drug". Thus, no meaningful search can be made on the above claims.

<b>A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))</b> Int. Cl <sup>1</sup> C12N15/09, C07K7/08, C07K14/705, C07K16/28, C12N5/10, C12P21/08, C12Q1/68, A61K38/17, A61K39/395, A61K48/00, G01N33/15, G01N 33/50, G01N 33/53, G01N 33/566, G01N 33/577		
<b>B. 調査を行った分野</b> 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl <sup>1</sup> C12N15/09, C07K7/08, C07K14/705, C07K16/28, C12N5/10, C12P21/08, C12Q1/68, A61K38/17, A61K39/395, A61K48/00, G01N33/15, G01N 33/50, G01N 33/53, G01N 33/566, G01N 33/577		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使った電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) SwissProt/PIR/Geneseq, GenBank/EMBL/DDBJ/Geneseq, WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JICSTファイル (JOIS)		
<b>C. 関連すると認められる文献</b>		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO 00/29441 A1 (Takeda Chemical Industries) 2000.05.25 & EP 1132405 A1 & JP 2001-149072 A	1-35, 47-50
A	Hinuma, S. et al., New neuropeptides containing carboxy-terminal RFamide and their receptor in mammals. Nature Cell Biology, Vol. 2, p. 703-708 (2000)	1-35, 47-50
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 28. 11. 02		国際調査報告の発送日 10.12.02
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 田村 明 照 (印) 電話番号 03-3581-1101 内線 3448



## 第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 43-46 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、  
人体の治療方法に係る発明が記載されている。
2. ☒ 請求の範囲 36-42 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、  
請求の範囲の「化合物」「医薬」について、明細書には、本願発明のタンパク質を用いて所望の「化合物」を選別する一般的な方法が記載されているのみであり、具体的な化合物及びそれに対応する医薬については何ら記載されていない。してみると、上記「化合物」「医薬」に具体的にどのような物質が包含されるのかが不明であるから、前記請求の範囲について、有意義な調査をすることができない。
3. ☐ 請求の範囲                      は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。  
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**